



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

MAURILIA PALMEIRA DA COSTA

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS A
PARTIR DO USO DE NANOESTRUTURAS DE CARBONO E ZINCO

Recife

2018

MAURÍLIA PALMEIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE
MICOTOXINAS A PARTIR DO USO DE NANOESTRUTURAS DE CARBONO E
ZINCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

Recife

2018

...

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

Costa, Maurília Palmeira da

Desenvolvimento de sensores para identificação de micotoxinas a partir do uso de nanoestruturas de carbono e zinco / Maurília Palmeira da Costa - 2018.

130 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: Cesar Augusto Souza de Andrade

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Imunossensor 2. Aptassensor 3. Voltametria I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (orient.) II. Andrade, Cesar Augusto Souza de Valdir Luna de (coorient.) III. Título

610.28

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-446

Elaborado por Claudina Karla Queiroz Ribeiro CRB4/1752

MAURILIA PALMEIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE
MICOTOXINAS A PARTIR DO USO DE NANOESTRUTURAS DE CARBONO E
ZINCO**

Trabalho de conclusão apresentado para o
cumprimento das exigências para obtenção
do título de doutora em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Aprovada em: 23/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

Departamento de Bioquímica-UFPE (Membro Interno)

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves

Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica-UFPE (Membro Externo)

**Prof.^a Dr.^a Idjane Santana de Oliveira (Centro Acadêmico de Vitoria/UFPE-CAV
(Membro Externo)**

**Prof.^a Dr.^a Maira Galdino da Rocha Pitta (Programa de Pós-graduação em Inovação
Terapêutica/UFPE (Membro externo)**

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo sendo minha Força, Fortaleza em todos os momentos, jamais me deixou fraquejar, confirmando a cada dia que eu não estou só.

A minha querida família pelo amor incondicional, pela paciência, por estarem sempre presentes e unidos em todos os momentos e por jamais desistirem de mim!

Marcelino meu namorado, que aluguei inúmeras vezes para me ajudar, com paciência, compreensão contínua, palavras de motivação para que jamais desanimasse, o caminho até aqui não foi fácil, porém gratificante e de muito aprendizado.

Agradecimento a meus orientadores e mestres e exemplos de profissionais Profa. Dra. Maria Danielly e o Prof. Dr. Cesar Augusto pela oportunidade de mais um trabalho, mais um desafio mais uma oportunidade de aprendizado e crescimento profissional serei sempre grata.

A Isaack excelente profissional agradeço pela ajuda, paciência, ensinamentos, desafios que vivenciamos nessa jornada de doutorado, as noites de experimentos cansativas, mas as nossas resenhas (Eu, Você e Beto) tornavam o fardo mais leve, seu empenho e colaboração foi de grande valia, Muito Obrigado mexicano!

A Estefani pelo auxílio nas pesquisas, nunca hesitou em ajudar, das dúvidas e discussões que sentamos várias vezes para elucidar, da paciência e serenidade nas explicações há você muito obrigado!

Ítala minha querida IC, fundamental, pois juntas trabalhamos diariamente no desenvolvimento da pesquisa, na troca de conhecimento, partilhamos nessa jornada momentos difíceis e alegres, mas sempre juntas e hoje posso dizer que concluímos mais uma etapa. A você minha querida ‘‘ filha’’ assim que chamava muitíssimo Obrigado!!

Alberto, Karen e Giselle amigos, de grande competência que aluguei bastante independente de dias e horários, mas que em nenhum momento hesitaram a ajudar. Obrigado!

Agradeço a todos que fizeram e fazem parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados/BIONANO, minha segunda casa, pelos anos convivência, pesquisa, trabalho, aprendizado e amadurecimento. Muito gratificante, levarei vocês pra sempre no coração.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

À FACEPE pelo apoio financeiro. Obrigado, Deus abençoe!

RESUMO

Os alimentos estão propensos à contaminação por substâncias tóxicas produzidas por fungos e sua ingestão pode acarretar doenças que variam de acordo com o tipo de toxina, as principais aflatoxina B1 e a ocratoxina A. A detecção destas micotoxinas em alimentos é importante para avaliação dos níveis de concentração toleráveis pelo organismo humano, visto que as metodologias atuais demandam tempo, custo elevado e necessitam de mão de obra especializada. Novos métodos de detecção necessitam ser incorporados no mercado tendo em vista a necessidade de uma avaliação rápida e precisa destes contaminantes. O presente trabalho tem por finalidade o desenvolvimento de biodispositivos nanoestruturados para detecção das toxinas Aflatoxina B1 (AFB1) e Ocratoxina A (OTA). As plataformas sensoras desenvolvidas, baseada em cisteína (Cys), nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupo carboxílico (MWCNT) e anticorpo monoclonal anti-AFB1 (AcAFB1); e outra baseada em Cys, nanopartículas de óxido de zinco aminadas (ZnONPs) e aptâmero específico para OTA (APT). A Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e Voltametria Cíclica (VC) foram utilizadas para monitorar o processo de construção das plataformas sensoras e os eventos de interação e reconhecimento de AcAFB1 e APT frente às micotoxinas de estudo. As análises topográficas dos sistemas foram realizadas por microscopia de força atômica (AFM). Para os processos de modificação da superfície dos eletrodos de trabalho foram comprovadas perturbações na transferência de elétrons após cada etapa de construção para os sistemas Cys-MWCNT-AcAFB1 e Cys-ZnONPs-APT. O sistema Cys-MWCNT-AcAFB1 apresentou uma resposta linear no intervalo de concentração de 0,1 a 20 pg.mL^{-1} , enquanto que o sistema para OTA apresentou faixa de detecção entre 0,1 a 15 pg.mL^{-1} . As plataformas nanoestruturadas apresentaram uma ótima sensibilidade e especificidade frente as toxinas em estudo, podendo ser empregadas para identificação da AFB1 em farinha de milho e OTA para café moído e torrado.

PALAVRAS-CHAVES: Imunossensor. Aptassensor. Voltametria. Impedância. AflatoxinaB1.Ocratoxina A.

ABSTRACT

Foods are prone to contamination by toxic substances produced by fungi and their ingestion can lead to diseases that vary according to the type of toxin, the main aflatoxin B1 and ochratoxin A. The detection of these mycotoxins in food is important for the evaluation of levels of concentration tolerable by the human organism, since the current methodologies demand time, high cost and need specialized labor. New detection methods need to be incorporated into the market in view of the need for a rapid and accurate assessment of these contaminants. The present work aims at the development of nanostructured biodispositives for the detection of toxins Aflatoxin B1 (AFB1) and Ochratoxin A (OTA). The sensor platforms developed, based on cysteine (Cys), carboxyl group functionalized multiple wall carbon nanotubes (MWCNT) and anti-AFB1 monoclonal antibody (AcAFB1); and another based on Cys, aminated zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) and aptamer specific for OTA (APT). Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and Cyclic Voltammetry (VC) were used to monitor the construction process of the sensor platforms and the interaction and recognition events of AcAFB1 and APT against the study mycotoxins. The topographic analyzes of the systems were performed by atomic force microscopy (AFM). For the processes of surface modification of working electrodes, electron transfer perturbations were demonstrated after each construction step for the Cys-MWCNT-AcAFB1 and Cys-ZnONPs-APT systems. The Cys-MWCNT-AcAFB1 system presented a linear response in the concentration range of 0.1 to 20 pg.mL^{-1} , while the OTA system showed a detection range of 0.1 to 15 pg.mL^{-1} . The nanostructured platforms presented an excellent sensitivity and specificity against the toxins under study and could be used to identify AFB1 in corn flour and OTA for ground and roasted coffee.

KEYWORDS: Immunosensor. Aptasensor. Voltammetry. Impedance. Aflatoxin B1. Ochratoxin A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química das Aflatoxinas -----	19
Figura 2- Estrutura química da Ocratoxina A -----	23
Figura 3- Representação esquemática do biossensor-----	26
Figura 4- Interação anticorpo-antígeno-----	31
Figura 5- Esquema da estrutura secundária em aptâmeros-----	32
Figura 6- Formação do complexo do aptâmero-alvo-----	33
Figura 7- Estrutura química da molécula de cisteína -----	35
Figura 8- Formas geométricas dos NTCs-----	36
Gráfico 1- Voltamograma cíclico-----	41
Gráfico 2- Diagrama de Nyquist-----	43
Figura 11- Princípio de força atômica -----	45
Figura 12- Gráfico de força interatômica vs. distância -----	45

Artigo 1

Figure 1- Schematic construction of AFB1 immunosensor based on carbon nanostructures and cysteine for use in food safety -----	89
Figure 2- 3D AFM images of Cysteine SAM (a), Cys-CNT (b), Cys-CNT-AcAFB1 (c), Cys-CNT-AcAFB1-BSA (d), Cys-CNT-AcAFB1-BSA-AFB1 as positive sample (e) and Cys-CNT-AcAFB1-BSA-OTA as negative sample (f). Scan area of 10- μ m $\times$ 10 μ m-----	90
Figure 3- Nyquist plots (A) and cyclic voltammograms (B) for each step in the assembling of the immunosensor. Inset: Equivalent circuit used to fit the impedance results-----	90
Figure 4- Nyquist plots (A) and histogram of ΔR_{ct} (%) of the immunosensor (B) after exposure to different concentrations of AFB1 standard (0.1, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, 11.0, 15.0 and 20.0 pg/mL). Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are reported as the mean values $\pm$ their half-deviation (less than 1%) -----	91

Figure 5- Nyquist plots (A) and histogram showing the ΔR_{ct} (%) of the immunosensor after exposure to corn flour infected with AFB1 as positive samples [0.1, 5.0, 9.0, 11.0 and 15.0 pg/mL] (B) and with OTA as negative samples (0.1, 5.0, 10.0 and 15.0 pg/mL) (C). Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are reported as the mean values $\pm$ their half deviation (less than 1% ----- 91

Patente

Figura 1- Preparação de biossensores eletroquímicos baseados em nanoestruturas de carbono e cisteína para seu uso em segurança alimentar ----- 128

Figura 2- Espectros de FTIR-ATR capturados nas etapas de modificação do eletrodo. a) eletrodo de ouro, b) cisteína, c) nanotubo de carbono e d) AcAFB1 ----- 128

Figura 3- Imagens obtidas pela técnica de AFM correspondentes à morfologia e topografia do eletrodo de ouro nas distintas etapas da preparação ----- 128

Figura 4- Respostas de espectroscopia de impedância eletroquímica na forma de gráficos de Nyquist para a) amostras padrão de aflatoxina B1 (pura; a-0.1 pg/mL, b-1 pg/mL, c-3 pg/mL, d-6 pg/mL, e-9 pg/mL, f-11 pg/mL, g-13 pg/mL), b) amostras de farinha de milho contaminada com AFB1; (a-0.1 pg/mL, b-5 pg/mL, c-9 pg/mL, d-11 pg/mL, e-15 pg/mL), c) circuito equivalente empregado para o fitting das respostas obtidas ----- 128

Figura 5- Gráfico da variação relativa de R_{ct} com respeito à concentração de AFB1 padrão em solução aquosa (círculos maiores pretos) e a variação relativa de R_{ct} obtida para as amostras de farinha de milho contaminada com AFB1 com respeito à sua concentração (círculos menores vermelhos) ----- 130

Artigo 2

Figura 1- Schematic construction the modification process of the Cys_NTC_ZnO_Apt-modified electrode ----- 59

Figura 2- 3D AFM images of gold electrode (a), Cys (b), Cys-CNT-ZnONPs(c), Cys-CNT-ZnONPs-Apt (d), Cys-CNT-ZnONPs-Apt-OTA as positive sample (e) and Cys-

CNT-ZnONPs-OTA-AFB1 as negative sample (f). Scan area of $10\text{-}\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ -----

----- 59

Figura 3- Voltammetric analysis of the assembly process is shown in (3a), EIS data were fitted with a Randles equivalent electrical circuit (3b)-----

----- 60

Figura 4- To assess reproducibility and standard experimental deviation (S.D.), The voltammetric (a) and impedimetric (b) responses of the aptasensor against OTA (1, 25, 50, 75 and 100 pg.mL^{-1}) are shown in Fig. 4-----

----- 60

Figura 5- The relationship between ($\Delta R_{ct}\%$) and OTA concentration is shown in Fig. 5a, 5b shows a plot of θ as a function of the OTA concentration-----

----- 61

Figura 6- The analytical results ($R_{ct}\%$) for the OTA recognition in roasted coffee samples are presented -----

----- 61

LISTA DE TABELAS

Patente

Tabela 1- Resultados para as amostras de AFB1 pura utilizada para a curva de calibração, como para as amostras de farinha de milho contaminada -----	105
Tabela 2- Os valores % ΔR_{ct} como resultado do cálculo do erro corresponde ao desvio dos resultados obtidos por triplicata em cada ponto -----	118

Artigo 1

Table 1 - Results obtained by modelling the data with basis in the equivalent circuit-----	91
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

MFA	Microscopia de força atômica
AFB1	Aflatoxina B1
AcAFB1	Anticorpo Monoclonal de Aflatoxina B1
Cys	Cisteína
EDC	N-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IAC	Cromatografia de imunoafinidade
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer
JECFA	Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da Mundial de Saúde
CL	Cromatografia líquida
mL	Mililitro
MWCNT	Nanotubos de carbono parede múltipla
NHS	N-hidroxissuccinimida
NTC	Nanotubos de Carbono
OTA	Ocratoxina
pg	Picograma
PDD	Poli (cloreto de dialildimetilamônio)
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples
TLC	Cromatografia de camada fina
VC	Voltametria cíclica
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	OBJETIVO GERAL	18
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	MICOTOXINAS	19
2.1.1	AFLATOXINA B1	21
2.1.2	OCRATOXINA A	22
2.1.3	PRINCIPAIS MÉTODOS CONVENCIONAIS PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1 E OCRATOXINA A	24
2.2	BIOSSENSORES	25
2.3	TRANSDUTORES	27
2.4	IMUNOSSENSORES	30
2.5	APTÂMEROS E APTASENORES	31
2.5.1	A TÉCNICA DE SELEX	33
2.6	MODIFICAÇÕES DA SUPERFÍCIE SENSORA	34
2.6.1	CISTEÍNA	34
2.6.2	NANOTUBOS DE CARBONO (NTC)	36
2.6.3	NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO (ZNONPS)	38
3	MÉTODOS ELETROQUÍMICOS	39
3.1	VOLTAMETRIA CÍCLICA	39
3.2	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA	41
3.3	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	44
4	RESULTADOS	47
4.1	ARTIGO 1 -APTAMER-BASED ELECTROCHEMICAL NANO-BIOSENSOR FOR DETECTING OCHRATOXIN A IN ROASTED COFFEE	50
5	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE 1- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MICROCHIMICA ACTA	86
	APÊNDICE B- PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL	95

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e a manutenção da vida de uma pessoa são mediados pelo consumo diário de alimentos, visto que esses alimentos podem ser responsáveis pelo surgimento de doenças, podendo estar contaminados por fungos (FAISANDIER et al., 2015). Esta contaminação torna-se elevada quando os indivíduos expostos sofrem de problemas respiratórios ou possuem um sistema imunológico fragilizado, a exposição pode causar o aparecimento de sintomas e/ou patologias, que dependerá das espécies presentes, dos produtos metabólicos, da concentração e duração da exposição do indivíduo, como também da suscetibilidade individual (GOYER et al., 2001).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por muitas espécies fúngicas. Dentre as micotoxinas podemos destacar as aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1, o ácido fusárico, as fumonisinas (B1 e B2), ocratoxinas (A, B e C), patulina, zearalenona e tricotecenos. A produção destas toxinas durante o crescimento fúngico podem desencadear doenças conhecidas como micotoxicoses (BENNETT et al., 2003).

A presença das micotoxinas vem a acarretar uma perda econômica preocupante devido à redução da qualidade de alimentos para os seres humanos e animais. Além disso, produzem efeitos deletérios, principalmente quando absorvidas por via oral, como também ao serem inaladas ou absorvidas pela pele (MEDEIROS et al., 2015).

Dentre os fungos produtores de micotoxinas podemos destacar as Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1) que possuem como fungos produtores os *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (PEREIRA et al., 2002). Os fungos *Aspergillus spp* e *Penicillium spp*, são elementos produtores de Ocratoxinas (A, B e C), com destaque ao *Aspergillus ochraceus* responsável pela produção de ocratoxina A. Estas toxinas são classificadas como metabólitos secundários tóxicos (MISHRA et al., 2016).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos limites máximos em alimentos são previstos na legislação. Em 2002, foi publicada no Diário Oficial da União a resolução RDC nº 274 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) destacando o estabelecimento dos limites máximos de aflatoxinas permitidos para os alimentos susceptíveis à presença de micotoxinas (leite fluido, leite em pó, amendoim, pasta de amendoim, milho em grão, farinha ou sêmola de milho. Para os demais produtos alimentícios destinados ao consumo humano, ainda prevalece à legislação de 1974, do

Ministério da Saúde, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos Resolução no 34/76 publicada no Diário Oficial da União, em 19 de janeiro de 1977 (BRASIL, 1977).

Já para as ocratoxinas podemos destacar a ocratoxina A (OTA), pois representa uma das micotoxinas mais prevalente na contaminação de diversos produtos agrícolas, causando riscos à saúde, de acordo com Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC). As ocratoxinas são produzidas por cepas de *Aspergillus* e *Penicillium* presentes em cereais, café e pão. A ocratoxina A é mais frequente e a mais tóxica, além de apresentar efeitos nefrotóxicos, imunossupressores, carcinogênicos e teratogênicos (PERAICA et al., 2000; MURPHY et al., 2006).

Para identificação e quantificação de AFB1 e OTA em diferentes produtos são empregadas técnicas como: cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia líquida (LC), cromatografia de imunoafinidade (IAC), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (KHAYOON et al., 2010), cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS) (NONAKA et al., 2009; BACALONI et al., 2008) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (LI et al., 2009). Os métodos citados apresentam sensibilidade, mas há a necessidade, principalmente pela indústria alimentícia de métodos mais rápidos, simples e de baixo custo. Como estratégia para tal desafio tem-se o desenvolvimento de biossensores.

Os biossensores são definidos como dispositivos que atuam por meio de reações biológicas na detecção do analito (químico/biológico) (WANG 2000). Para que o biossensor seja funcionalizado é necessário à combinação de um componente biológico, que interaja com um substrato alvo a um transdutor, convertendo os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (WANG 2000; PATHAK et al., 2007).

A empregabilidade dos biossensores é vasta podendo ser empregados em várias áreas como, saúde, ambiental, alimentícia e até na prevenção de bioterrorismo. Por serem altamente sensíveis e seletivos, possuem facilidade em termo de preparação da plataforma sensora na superfície do sensor (PATHAK et al., 2007; LEE 2008).

Os transdutores adotados para o desenvolvimento de biossensores podem ser do tipo eletroquímico, óptico, piezelétrico ou calorimétrico. Estes elementos atuam em uma interface, medindo a mudança física ou química que ocorrerá na camada de

bioreconhecimento (WANG 2000; PATHAK et al., 2007; LEE 2008). Os biossensores eletroquímicos destacam-se por apresentarem vantagens como baixo custo, alta sensibilidade, *screening* rápido e estabilidade (SONG et al., 2006).

Diversas biomoléculas podem ser utilizadas no desenvolvimento de um biossensor, no entanto, os anticorpos se destacam pela possibilidade de se explorar diversos tipos de antígenos de interesse biomédico. O sinal obtido de um imunossensor é baseado na reação biológica do complexo antígeno-anticorpo, onde o antígeno ou anticorpo está imobilizado na superfície do sensor (MORGAN et al., 1996).

Outro tipo de sistema sensor que vem ganhando destaque são os aptasensores, baseados em aptâmeros, que são oligonucleotídeos ou peptídeos que se ligam à moléculas-alvo específicas. Aptâmeros são normalmente criados através de seleção de sequências oligonucleotídicas ou peptídicas a partir de um conjunto de sequências aleatórias (O'SULLIVAN, C.K. 2002). Estes elementos podem exibir seletividade e aplicabilidade na área de biossensores.

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos se baseia no uso de ferramentas eletroquímicas como elementos de transdução associados às biomoléculas de interesse. No entanto, a interface com a nanotecnologia é de grande destaque nesta área por propiciar melhoria do sinal eletroquímico a ser captado e favorecer um aumento da área de superfície disponível para a adsorção física ou química de biomoléculas que servirão como elementos de biodeteção. Como consequência, diversas nanoestruturas como as nanopartículas metálicas e os nanotubos de carbono se destacam no uso de biossensores eletroquímicos (PEREIRA et al., 2002).

Os nanotubos de carbono (NTC) vêm sendo empregados em biossensores por apresentar uma boa condutividade e propriedades eletrônicas e mecânicas. Além de possuírem uma rede hexagonal de átomos de carbono podendo ser classificados em nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT), ou de parede múltipla (MWCNT) (LU 2006; YOGESWARAN et al., 2008; WANG 2009). Estes elementos se destacam na construção de sensores tendo como elementos de reconhecimento os anticorpos ou aptâmeros (MISTRY et al., 2014).

A utilização do óxido de zinco, por sua vez, corresponde a um tipo de nanopartícula de óxido metálico, que possui estabilidade química e exibe um grau significativo de

seletividade a substâncias tóxicas (PATEL et al., 2016). Em adição, as nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO), apresentam uma notoriedade devido a sua estabilidade física e química, alta capacidade oxidativa, baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade (SEONGPIL et al; 2014; NAI-FENG et.al., 2014; JUAN et al., 2011). Além disso, as NpsZnO possuem estabilidade a longo prazo, alta sensibilidade e confere provável aumento do sinal eletroquímico (SALIH et.al., 2016), garantindo sua aplicação em biossensores.

É crescente o interesse das indústrias de alimentos em financiar tecnologias para o desenvolvimento de sensores relacionados à identificação de patógenos, toxinas alimentares de maneira rápida, precisa e específica (EMBRAPA, 2008). Essas tecnologias auxiliam os serviços de inspeção no monitoramento dos produtos alimentícios empregando uma maior agilidade dos resultados favorecendo o controle e a garantia de qualidade dos produtos alimentícios.

Desta forma, torna-se primordial a aplicação de métodos de análises sensíveis à micotoxinas e de resultados rápidos, que permitam avaliar a qualidade e inocuidade do alimento a ser analisado. A busca por alternativas que visem o diagnóstico rápido e preciso são importantes na detecção das micotoxinas (AFB1 e OTA), uma vez que os alimentos podem conter a toxina e com isso podem desencadear casos graves de intoxicações alimentares como também risco de vida.

Com base nisto, esta tese se propôs a desenvolver sistemas de detecção de micotoxinas alimentares AFB1 e OTA, baseados em nanotubos de carbono, nanopartículas de óxido de zinco, anticorpos e aptâmeros visando a aplicação em amostras de farinha de milho e café moído e torrado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Desenvolver ferramentas complementares de detecção de micotoxinas baseadas em nanoestruturas de carbono, óxido de zinco, anticorpos e aptâmeros.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliação físico-química dos parâmetros relacionados às etapas de modificação da superfície do eletrodo metálico;
- Determinação das propriedades bioeletroquímicas da modificação covalente do MWNT e MAb e MWNT-ZnO e Apt;
- Avaliação dos fenômenos interfaciais do sistema Cys-MWNT-Mab e Cys-MWNT-ZnO-Apt, suas utilizações para fabricação dos biodispositivos ;
- Caracterização da interação do sistema Cys-MWNT-MAb com as AFB1 e Cys-MWNT-ZnO-Apt com a OTA através das técnicas de EIE e VC;
- Avaliação teórica da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) e da resistência à transferência de carga (Zre) através de circuitos equivalentes;
- Determinação das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos;
- Análise morfológica e estrutural da superfície dos eletrodos metálicos através de técnica de microscopia de força atômica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 MICOTOXINAS

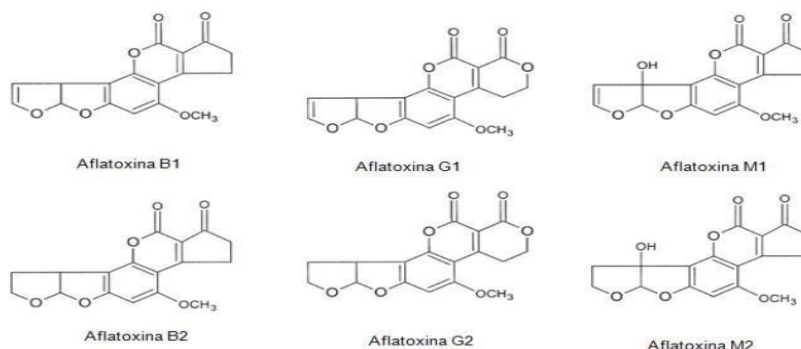
A terminologia empregada a micotoxina deriva da palavra grega “mykes” que significa fungo e do latim “toxican” que significa toxinas. Este termo é empregado para classificar um grupo de compostos que são produzidos por algumas espécies fúngicas podendo causar doenças ou até a morte quando consumidas pelo homem ou animais. (BENETT e KLICH, 2003).

As micotoxinas podem ser definidas como substâncias tóxicas oriundas do metabolismo secundário dos fungos, constituídas por compostos orgânicos e apresenta um amplo espectro de toxicidade. Além disso, apresentam baixo peso molecular, baixa imunogenicidade, são termo-estáveis e atuam em baixas concentrações (BOK et al., 2004; BIEHL e BUCK, 1987; DINIZ, 2002).

Destaca-se que o Brasil é um país propício ao desenvolvimento de micotoxinas, pelo fato de apresentar condições favoráveis de clima tropical, subtropical e temperatura (DILKIN, 2002). É observado que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas produzidos e consumidos no mundo estejam contaminados por micotoxinas (BENETT e KLICH, 2003).

As Aflatoxinas apresentam uma variedade de estruturas químicas com baixo peso molecular como mostrado na figura 1. As micotoxinas são classificadas de acordo com o grau de toxicidade em ocorrência a homens e animais. De acordo com a variação da natureza química das micotoxinas são necessários numerosos métodos de extração das toxinas em alimentos que contribui de forma negativa para o controle (PURCHASE, 1974).

Figura1 – Estrutura química das principais aflatoxinas de importância na contaminação de alimentos.



Fonte: Wilson, 2005 (adaptado).

Existe uma vasta quantidade de micotoxinas já conhecidas destacando-se as aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina, fumosinas e tricotecenos (FREITAS et al., 2012). De modo geral, essas micotoxinas afetam órgãos e tecidos, induzindo a diversas patologias, como neoplasia, mutagênese, teratogênese, imunossupressão entre outras (FERNANDEZ et al., 1997; FERNANDEZ, 2004; KIESSLING, 1986). Uma grande parte das micotoxinas são termorresistente, mantendo sua toxicidade, mesmo após os processos de melhoramentos de rações ou preparação de conservas (SOARES e FURLANI, 1996).

Destaca-se as condições ambientais: umidade do substrato e temperatura do ambiente são primordiais na conservação do alimento, temperatura é um dos principais fatores envolvidos nesse processo de produção de rações, a faixa viável de escolha para a sua produção situa-se entre 11 e 37°C. No quadro 01 estão os limites estabelecidos pelos países do MERCOSUL (Argentina, Paraguai e Uruguai). Européia e o Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos têm seus limites estabelecidos de acordo com o Codex Alimentarius ou legislações específicas.

Quadro 1- Limites máximos de concentração de aflatoxinas no Brasil.

ALIMENTO	AFLATOXINA	LIMITE
Leite		
Leite fluido	M1	0,5 µg/L (0,5 ppb)
Leite em pó	M1	5,0 µg/kg (5 ppb)
Milho		
Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído). Farinhas ou sêmolas de milho	B1+B2+G1+G2	20,0 µg/kg (20 ppb)
Amendoim		
Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), Pasta de amendoim ou manteiga de amendoim)	B1+B2+G1+G2	20,0 µg/kg (20 ppb)

Fonte: Resolução da diretoria colegiada nº 274, Anvisa, Brasil, 2002.

As alterações patológicas e/ou funcionais no organismo, causadas pelas micotoxinas são denominadas de micotoxicoses; doenças transmitidas por alimentos contaminados por microorganismos patogênicos (VAN AMSON et al., 2006). A gravidade da infecção depende da toxicidade da micotoxina produzida pelos fungos, do período de exposição à toxina e o estado nutricional do indivíduo (FERREIRA et al., 2006). O contato humano com alimentos contaminados por micotoxinas é um dos grandes problemas da Saúde Pública (AMARAL et al., 2006).

Dentre as micotoxinas existentes o estudo foi direcionando para a aflatoxina B1 e Ocratoxina A devido sua prevalência em diferentes tipos de alimentos.

2.1.1 AFLATOXINA B1

As aflatoxinas são oriundas dos metabólitos secundários que podem ser produzidos por fungos como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus* (YU et al., 2005). Podem ser encontradas em inúmeros produtos alimentícios, como milho, trigo, farinha de trigo, cevada, nozes, pistache, arroz, amêndoa, feijão, frutas secas e cerveja, além de estar presente em rações e produtos de origem animal contaminado por rações (VENTURA et al., 2004; LIU et al., 2006).

Essas micotoxinas são derivadas do bisfurano cumarina e consideradas como responsáveis por lesões hepáticas de natureza cancerígena que se manifestam em animais e no homem (MERCK, 1996; OGA, 1996; PAPP et al., 2002). Substratos com elevado teor de umidade ou grãos com danos mecânicos e predominância de altas temperaturas e umidade relativa do ar contribuem com a biossíntese de aflatoxinas (BULLERMAN et al; 1984; JAIMEZ et al., 2000; PAPP et al., 2002; TARÍN et al., 2004; ABBAS et al., 2006).

Existe vários compostos derivados de aflatoxinas, o destaque é para quatro compostos de interesse médico-sanitário: as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, que apresentam uma elevada toxicidade. A Aflatoxina B1 (AFB1) é o metabólito mais importante, pois apresenta elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos, seguida das aflatoxonas G1, B2 e G2.

As aflatoxinas são comumente encontradas em diversos alimentos utilizados como ração de animais, principalmente em grãos (MALLMANN et al., 1994). São toxinas de baixo peso molecular, e de reduzida hidrossolubilidade, porém, são bastante solúveis em solventes de polaridade intermediária (MERCK, 1996).

Os efeitos pró-carcinogênicos da AFB1 estão relacionados à manifestação de seus efeitos tóxicos que requer a ativação metabólica, cuja forma ativada é o composto 8,9-

óxido de AFB1 (WOGAN, 1992). Esse composto pode reagir rapidamente por ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas como nucleótídeos (DNA e RNA) e proteínas, o que comprova seu maior efeito tóxico quando comparado ao das outras três aflatoxinas (WOGAN, 1992; Santos et al., 2001). O consumo elevado de aflatoxinas podem ser letal, porém, no caso de exposições subletais pode levar a toxicidade crônica, o que resulta em neoplasias em diversas espécies de animais (COULOMBE, 1991).

Os mecanismos de toxicidade e biotransformação das aflatoxinas estão relacionados a sua absorção pelo trato gastrointestinal, sendo, biotransformadas por enzimas hepáticas com funções oxidases que pertencem à família de enzimas do sistema citocromo P-450 (FORRESTER et al., 1990). A ativação metabólica de AFB1 produz o composto AFB1-epóxido (8,9-óxido de AFB1), por meio da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico da molécula de AFB1 (PAPP et al., 2002).

AFB1 na forma ativada é altamente eletrofílica e as ligações ocorridas com nucleotídeos e proteínas conduz a formação de aductos, caracterizando a primeira lesão bioquímica, ou ainda podem conjugar-se a glutatona reduzida (HSIEH e ATKINSON, 1991; FATEMI et al., 2006). Diversos tipos de carcinomas são resultados da ligação entre AFB1 e as guaninas da molécula de DNA, devido à modificação estrutural que compromete a atividade biológica deste nucleotídeo (TONG et al., 2006; LIN et al., 2006).

Os efeitos mutagênicos se processam em duas fases diferentes classificadas como iniciação e promoção de neoplasia (REDDY et al., 2006). As mutações ocorridas a nível celular determinam a fase de iniciação, e a promoção neoplásica se dá com expressão fenotípica das modificações primárias (GEYIKOGLU e TURREZ, 2005). As lesões bioquímicas geradas em RNA e proteínas caracterizam mecanismos de toxicidade aguda da AFB1 por conduzir à morte celular (CHOY, 1993).

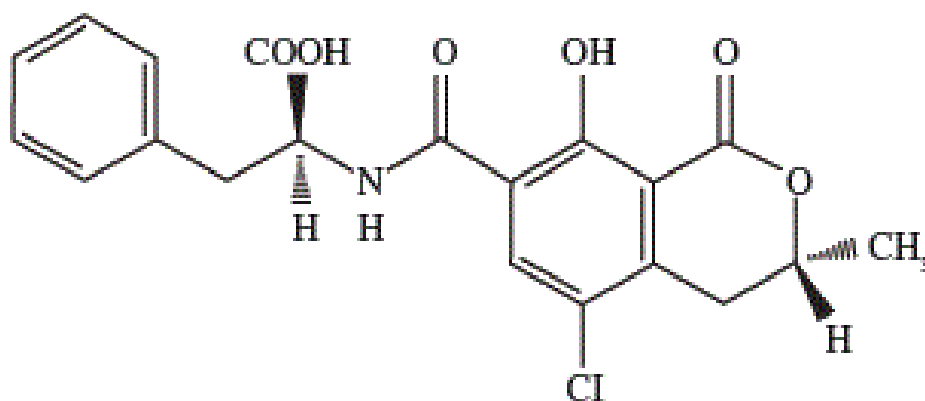
2.1.2 OCRATOXINA A

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina que foi descoberta em 1965, por meio do isolamento de um metabólito de *Aspergillus ochraceus* durante estudos que tinham como objetivo a descoberta de novas moléculas de micotoxinas (VAN DER MERWE et al., 1965). Esta toxina apresenta estrutura química semelhante a das aflatoxinas, sendo representada por uma isocumarina substituída, ligada a um grupo de L- fenilalanina (figura 2).

Dentre os *Aspergillus* a espécie *A. ochraceus* são capazes de produzir ocratoxina A. Além dessa espécie, também *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus*

carbonarius, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus meleus* e *Aspergillus niger*, além de *Penicillium nordicum* e *Penicillium verrucosum*, são produtores de ocratoxina A (CIEGLER et al., 1972; PITT, 1987; CHU, 1974; ABARCA et al., 1994; LARSEN et al., 2001; BAYMAN et al., 2002).

Figura 2. Estrutura química da Ocratoxina A, toxina envolvida em contaminação alimentar.



De acordo com a classificação da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), a ocratoxina A se encontra no grupo 2B, o que indica uma possível ação carcinogênica para humanos, apresentando atividade mutagênica/teratogênica e imunossupressora. Além de apresentar ação nefrotóxica associada à doença renal conhecida como Nefropatia balcânica endêmica (ALBUQUERQUE, 2016). A contaminação por ocratoxina A é considerada um problema de saúde pública, apresnetando grande impacto à saúde de lactentes e crianças jovens devido à sua alimentação (PELUQUE, 2016).

O tempo de meia-vida para produtos contaminados com OTA leva um tempo maior para serem excretados do organismo (CREPPY, 1999). A estrutura química da OTA apresenta semelhança com as aflatoxinas, sendo representada por uma isocumarina substituída, ligada a um grupo L- fenilalanina como destacado anteriormente (CIEGLER et al., 1972; PITT, 1987; CHU, 1974; ABARCA et al., 1994; LARSEN et al., 2001; BAYMAN et al., 2002).

A presença de OTA têm sido detectada em produtos essenciais para o consumo humano diário, entre os quais podemos destacar: uva, café, aveia, trigo, milho, arroz, cevada, alimentos infantis, cacau, entre outros (ALBUQUERQUE et al., 2016; BENITES et al., 2017; HYUM et al., 2015; CAPPOZZO et al., 2017; VILLAMIZAR et al., 2017).

O processo de contaminação pode ocorrer em campo a partir do manuseio inadequado do equipamento usado para processar a comida, além do transporte e armazenamento inadequados devido à umidade e temperatura favoráveis ao crescimento do fungo (KUMERA et al., 2017).

O Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial de Saúde (JECFA) estabelece como nível tolerado cerca de 112 ng OTA por semana (DACHERY et al, 2016). Desta forma, o uso de métodos que detectam níveis abaixo do estabelecido é essencial para o controle de alimentos consumidos diariamente.

No Brasil alguns trabalhos comprovam a presença de OTA no café, com destaque para a contaminação de café verde por OTA comprovado por Leoni et al em 2001 para cinco estados brasileiros (Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo e Bahia). Os autores encontraram 20,45% das 132 amostras contaminadas, sendo que a concentração média foi de 7,1 ppb de ocratoxina A. Em adição, Prado et al. (2000) constataram que as amostras de café solúvel e café torrado e moído comercializados em Belo Horizonte/MG, continham níveis de ocratoxina A entre 0,31 e 1,78 ppb e 0,99 e 5,87 ppb, respectivamente.

Outro estudo feito com 82 amostras de café instantâneo comercializados em São Paulo apresentou 98,8% das amostras contaminadas com ocratoxina A, com níveis variando de 0,17 a 6,20 ppb. A alta frequência de OTA encontrada nestas amostras ressalta a importância do controle deste produto pela indústria e pelas autoridades (ALMEIDA et al., 2007).

Destaca-se de suma importância o desenvolvimento de novas estratégias cada vez mais precisas para a detecção de micotoxinas, sendo os biossensores ferramentas alternativas, para evitar/reduzir impactos socioeconômicos que um alimento mundial como o café provoca, se a produção é afetada.

2.1.3 Principais Métodos Convencionais para Detecção de Aflatoxina B1 e Ocratoxina A

Desde a descoberta das aflatoxinas, foram iniciadas pesquisas para a criação de métodos empregados para detecção de micotoxinas em especial a AFB1 e OTA, encontrados em produtos agrícolas e derivados, e fluidos biológicos (LAMARDO et al., 2006). Os métodos mais comuns utilizados são métodos cromatográficos: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ensaio imunoenzimático colorimétrico de injeção sequencial (SIIA) e biossensores.

A CCD é um método de multidetecção que permite a separação dos compostos importantes para caracterização das micotoxinas (FERNANDES, 2007). A quantificação é realizada técnica visual sob luz ultravioleta ou a densitometria (STROKA e ANKLAM, 2000).

Os métodos de ultravioleta (UV), fluorescência, espectrometria de massas (LC-MS) e espectrometria de infravermelho próximo (NIR) utilizam a CLAE no processo de detecção, pois ela realiza uma seleção rápida do material (FERNANDES, 2007). No entanto, estas avaliações apresentam desvantagens como o alto custo dos equipamentos e de operação, além de necessitar de uma extensa experiência do pessoal técnico para obtenção máxima de benefício.

O ensaio ELISA é um método empregado para triagem na determinação das micotoxinas presentes numa certa quantidade de amostra, apresenta sensibilidade, especificidade, rápido tempo de análise e facilidade de manuseio, pois não é necessária prévia experiência (OLIVEIRA et al., 2000; LI et al., 2009). No entanto, o custo elevado torna esse método inadequado para programas de monitoramento e de controle de micotoxinas, além da possibilidade de revelar resultados falso-negativos (FERNANDES, 2007).

Desta forma, há a necessidade de métodos que apresentem vantagens como análise dos resultados em tempo real, boa sensibilidade e que não seja necessária purificação prévia da amostra e de fácil manuseio. Com isso o emprego dos biossensores é a alternativa para detecção de toxinas em especial a AFB1 e OTA (RUMAYOR et al., 2005).

O emprego de técnicas eletroquímicas e imunológicas, sensíveis e específicas para contaminantes biológicos, têm demonstrado vantagens na detecção e menor custo das análises em relação aos kits comerciais que apresentam uma detecção limitada a diferentes subgrupos de uma determinada toxina (RUMAYOR et al., 2005; EMBRAPA, 2008).

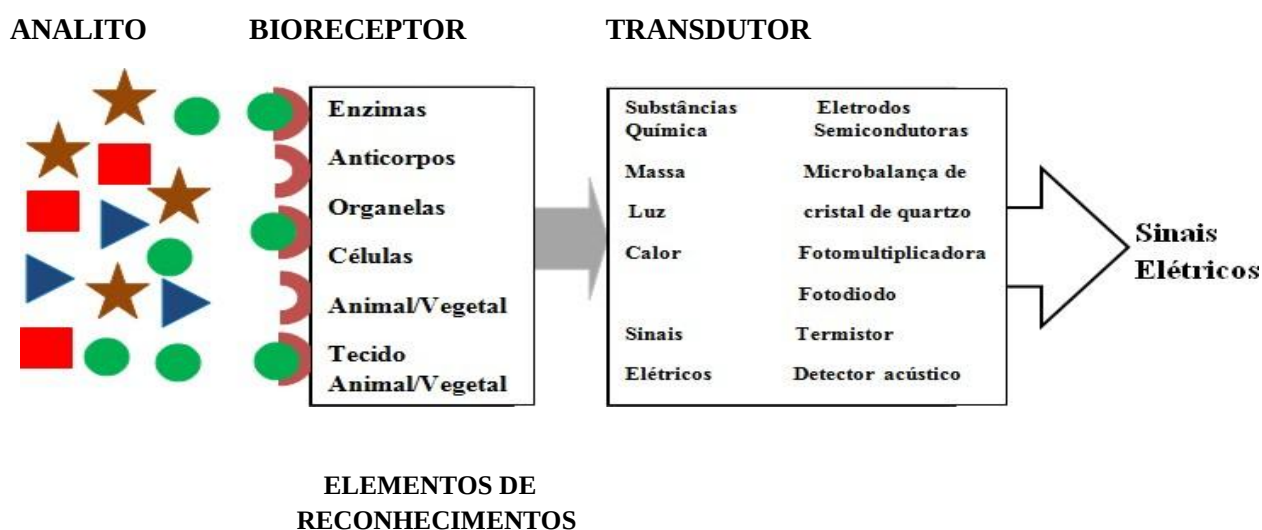
2.2 BIOSSENSORES

O emprego dos biossensores teve como ponto de partida o desenvolvimento de um sensor enzimático no ano de 1956 por Leland e Clark. Desde então, os biossensores obtiveram uma expansão de sua utilização nas pesquisas na área biomédica e química. Associado a simplicidade de confecção combinada com a especificidade de um elemento

biológico ativo para com o analito de seu interesse, os biossensores oferecem uma sensibilidade elevada com a presença de um transdutor que converte o sinal proporcionalmente ao analito em questão (ZHANG et al., 2000).

Os biossensores apresentam como principal característica a capacidade de combinar a atividade seletiva de um elemento de reconhecimento biológico, sensível a um analito de interesse, e um transdutor, que converte um sinal biológico em elétrico. Os elementos de reconhecimento podem ser ácidos nucleicos (LI et al., 2007), organelas, tecidos animal ou vegetal, microorganismos, células (RICCARDI et al., 2002), enzimas, antígenos ou anticorpos (FERREIRA et al., 2006). Desta forma, é possível detectar o analito (figura 3) por meio de variações na massa, absorção ou emissão de luz, temperatura ou estado de oxidação. O princípio básico de funcionamento de um biossensor imunológico envolve reações entre o antígeno e o anticorpo específico que podem ser monitorados por um transdutor durante a quantificação dos complexos formados. O transdutor é definido como um dispositivo elétrico que responde à medida que o sinal é eletronicamente amplificado, armazenado e, então, exibido.

Figura 3. Representação esquemática de um biossensor, adaptada pelo autor.



Os biossensores amperométricos são classificados em três gerações (primeira, segunda ou terceira geração) de acordo com o processo envolvido na transferência de carga, reconhecimento do analito, geração e processamento do sinal.

Em 1979 foi demonstrada a transferência de elétrons direta entre enzima e eletrodo, por meio do uso de lacase e peroxidase, enzimas que utilizam o oxigênio e o peróxido de

hidrogênio como agentes oxidantes e redutores para a transferência direta de elétrons. Este tipo de biossensor depende da eletroatividade do substrato ou produto da reação eletroquímica, sendo considerados biossensores da primeira geração (AHUJAA et al., 2007).

Os biossensores classificados como de segunda geração dependem da presença de mediadores eletrônicos (materiais orgânicos, inorgânico, polímeros condutores ou complexos de metais de transição), que facilitam a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato. No entanto, esses biossensores podem passar por interferências durante a detecção. Esta classe de biossensores permite a obtenção de um dispositivo simplificado, miniaturizado e com boa sensibilidade e seletividade diminuindo efeitos de interferentes.

O grupo dos biossensores de terceira geração caracterizam-se pela transferência direta entre a enzima e a superfície do eletrodo sem o uso de mediadores.

A detecção por meio dos sensores pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na detecção direta a interação biológica ocorre por meio de um ligante não-catalítico que pode anticorpos e receptores celulares. A detecção indireta tem a necessidade de empregar anticorpos marcados com moléculas fluorescentes ou enzimas, oferecendo uma detecção simples e de maior sensibilidade (PATHAK et al., 2007; MEHRVAR et al., 2004; LIU et al., 2009).

Em adição, para compreender e analisar os sinais elétricos obtidos do comportamento do analito na superfície do sensor há necessidade de um transdutor que possa mensurar a natureza do material analisado e as possíveis interações que estão ocorrendo de forma na superfície do sensor.

2.3 TRANSDUTORES

Os transdutores são empregados para medir a mudança física ou química que ocorre na reação com o biorreceptor e atua transformando essa energia em um sinal mensurável. Estes elementos podem ser classificados como transdutor eletroquímico, óptico e piezelétrico (PATHAK et al., 2007; MEHRVAR et al., 2004; LEE 2008).

Transdutores Eletroquímicos – Estes transdutores são baseados no consumo e/ou geração de espécies eletroativas durante uma interação química e biológica (GAUA 2005), nesse processo o transdutor mensura o sinal eletroquímico gerado na interação (MEHRVAR et al., 2004; GAUA 2005). As técnicas eletroquímicas possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga (SONG et al.,

2006). Os biossensores eletroquímicos podem ser amperométricos, potenciométricos ou condutimétricos (MEHRVAR et al., 2004).

Destaca-se que os biossensores amperométricos tem como princípio a medida da corrente resultante da oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa em que ocorre a transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa. Nestes processos, o fluxo de elétrons é direcionando de acordo com as propriedades do analito e controlado pela aplicação de um potencial (THÉVENOT et al, 2001; WANG et al, 2008).

Os sensores potenciométricos são definidos de acordo com a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência. Em adição, os biossensores condutimétricos atuam na medição de mudanças na condutância, pelo fato do emprego de enzimas que catalisam reações produzindo ou consumindo espécies iônicas, com isso altera a quantidade de portadores de carga móvel no eletrólito, não sendo específica para um dado tipo iônico (MELO, 2008; WANG et al, 2008).

Ópticos - Atuam na detecção das mudanças das propriedades ópticas dos reagentes, produtos ou componentes do transdutor. São empregados em fibras ópticas para guiar as ondas de luz a detectores específicos. Os biossensores ópticos oferecem vantagens como facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético como também uma boa biocompatibilidade (MEHRVAR et al., 2004). Os sistemas ópticos podem empregar vários fenômenos ópticos incluindo absorbância, refletância, fluorescência, fosforescência, índice de refração, polarização, rotação, interferência e a ressonância plasmônica de superfície.

Piezoelétricos- Os biossensores piezoelétricos se baseiam na mudança de massa devido a interação do alvo ao elemento de reconhecimento (MEHRVAR et al., 2004). Os dispositivos piezoelétricos fundamentam-se na mudança de frequência produzida por um estresse mecânico em um cristal de quartzo oscilante, que está correlacionada com a ligação do alvo causando uma mudança na massa.

Os tipos de componentes biológicos empregados nos biossensores dependerá do tipo de interação a ser detectada (ANDRADE 2006; VIEIRA; FATIBELLO FILHO et al., 1992). Assim, de acordo com o elemento de biorreconhecimento os biossensores podem ser classificados em:

Enzimáticos: Este tipo de biossensor baseia-se na sensibilidade e seletividade de uma enzima imobilizada em um transdutor. Várias enzimas são utilizadas na fabricação de sensores, um exemplo da utilização das enzimas é a urease que atua na

determinação/monitoramento da ureia, tanto em aplicações médicas quanto ambientais (CHAMBERS et al., 2008).

Genossensores (Baseados em Ácidos Nucleicos e Aptâmeros): O desempenho dos genossensores é oriundo de oligonucleotídeos que são imobilizados na superfície do sensor estando conectado a um transdutor. Este dispositivo detecta genes específicos ou mutantes associados a doenças hereditárias (D'SOUZA 2001). O processo de detecção eletroquímica pode ser por oxidação direta ou catalisada, como também pela resposta eletroquímica que utiliza um marcador podendo ser uma enzima para uma reação específica com o alvo de DNA (SHARMA et al., 2003).

A pureza e comprimento médio da cadeia podem influenciar as atividades físicas do sensor de DNA (RAVERA 2007). É crescente o emprego de genossensores baseados em aptâmeros devido sua produção ocorrer de maneira sintética e são comumente identificados *in vitro* a partir de uma várias combinações que compreende trilhões de diferentes sequências, por um processo conhecido como evolução sistemática de ligantes o Selex – *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) (CHIU et al., 2009; MAHASHI et al., 2009; MAIRHOFER et al., 2009; HUA 2010). Seu processo de atuação envolve uma repetição de ligação, separação e amplificação do ácido nucléico (LOU, 2009).

Microbiológico: É formado pela associação de um transdutor com a célula microbiológica imobilizada (D'SOUZA 2001). Baseia-se no emprego de microorganismos como componente biológico podendo atuar como biocatalizadores (SHARMA et al., 2003). Apresenta desvantagem pelo fato da limitação na especificidade além da reposta necessitar de um tempo maior (D'SOUZA 2001; LEI 2006).

Imunossensores: Detectam alterações em um sistema quando o anticorpo ou fragmento do mesmo interage especificamente com um antígeno (GIL et al.,1999). Neste sistema, o antígeno ou o anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor. A especificidade do anticorpo é conferida pela complementaridade química do sítio de ligação com o antígeno, através de forças secundárias e da localização de grupos carregados, apolares e ligações de hidrogênio (ALI et al.,2011; GIL et al.,1999; NELSON 2014). Esta afinidade e especificidade de ligação faz com que os anticorpos e os antígenos sejam altamente seletivos e, por isto, são amplamente estudados e empregados em biossensoriamento.

2.4 IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Os imunossensores eletroquímicos baseiam-se no emprego de transdutores eletroquímicos e o analito submetido às análises que serão realizadas por técnicas eletroquímicas. Estes elementos apresentam vantagem por serem de baixo custo, facilidade de miniaturização e portabilidade (D’ORAZIO, 2003).

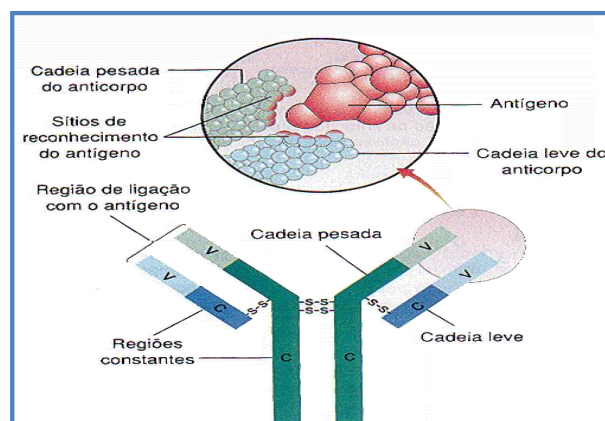
Os dispositivos imunossensores apresentam como princípio uma reação imunológica específica entre antígeno/anticorpo que será imobilizado na superfície do transdutor (KLAASSEN 2001; FATIBELLO FILHO 2002). Os anticorpos são glicoproteínas produzidos pelas células B e são funcionalmente definidos pelo antígeno com o qual reagem (KLAASSEN 2001).

O processo de funcionamento do imunoensaio ocorre através da interação do sítio combinatório do anticorpo com as porções mais superficiais do antígeno, formando o complexo antígeno-anticorpo. Tem como característica uma constante de afinidade em função das concentrações de interação complexo antígeno-anticorpo formado. Essas interações são mantidas por ligações de hidrogênio, forças eletrodinâmicas (Van der Waals) e hidrofóbicas o que confere especificidade antígeno-anticorpo (LUPPA et al., 2001; MOZAZ et al., 2004; SETFORD 2000; FERREIRA et al., 2005).

Quando a detecção dos imunoensaios não necessita de separação das espécies livres e marcadas, estes ensaios são chamados de imunoensaios homogêneos. No entanto, quando necessitam de uma quantificação e de uma etapa adicional para separar as frações livres das espécies marcadas falamos em imunoensaios heterogêneos (GIL et al., 2009).

O emprego de anticorpos como elemento de reconhecimento tem como fundamento a alta sensibilidade e especificidade das interações antígeno/anticorpo (SONG et al., 2006; CHAMBERS 2008). A figura 4 apresenta de modo geral a representação da interação do anticorpo-antígeno.

Figura 4- Representação da interação anticorpo-antígeno.



Fonte: Stryer, 2006.

A imunointeração entre proteínas em solução com suas proteínas complementares pode ser avaliada por medidas eletroquímicas (D'SOUZA 2001). Diante da possibilidade de diagnóstico de diversas patologias e elementos de interesse clínico por meio do reconhecimento anticorpo-antígeno esta tese se propõe em desenvolver um novo imunossensor para as micotoxinas aflatoxina B1 e ocratoxina A.

Atualmente é crescente a empregabilidade de imunossensores para detecção da aflatoxina B1. (COSTA et al 2017) desenvolveram um imunossensor livre de marcação com emprego de nanotubos de carbono para detecção de AFB1 em escala de picogramas com limite de detecção de 0,1pg/mL. A mesuração das micotoxinas na faixa de picogramas, advém da necessidade de se determinar estes elementos em mínimas concentrações e evitar contaminação alimentar. Desta forma, outros autores (ZHANG ey al., 2016) se propuseram a desenvolver sistemas de detecção, como o imunossensor baseado em nanotubos e quitosana para detecção da AFB1 com limite de detecção 3,5 pg/mL.

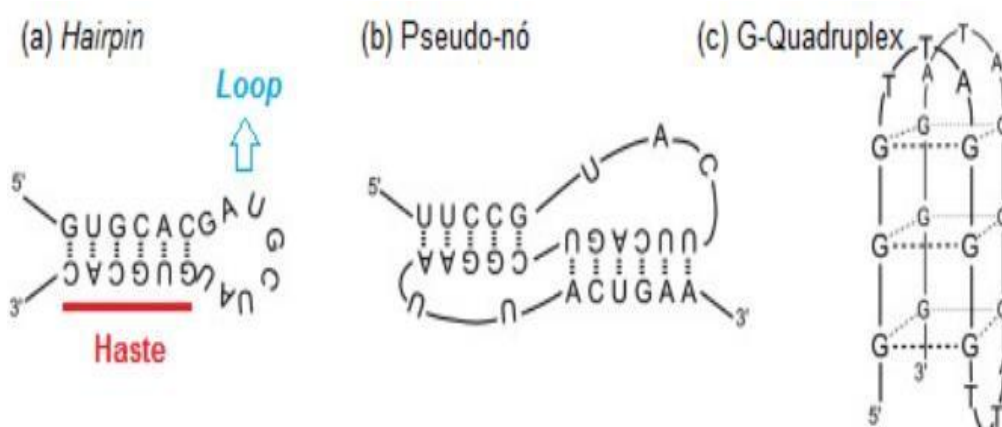
2.5 APTÂMEROS E APTASENSORES

A terminologia empregada para aptâmero deriva da palavra latina "aptus" que significa encaixe e da palavra grega "meros" - partes. Aptameros são denominados de oligonucleotídeos ou peptídeos de acordo com sua origem de obtenção, ou seja, são oriundos de RNA ou DNA (ssDNA – single strand DNA), de cadeia simples e curta (oligonucleotídeos) (MENCIN et al.,2014).

O emprego crescente dos aptassensores é devido uma ampla variedade moléculas alvo como ligantes tais como: proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, drogas, vitaminas, compostos orgânicos e inorgânicos (YOU et al, 2003). O tamanho dos aptâmeros varia em torno de 20 a 80 bases (8 a 25 kDa) (LEVY-NISSENBAUM et al., 2008).

A seleção dos aptâmeros é feita *in vitro*, para se ligarem a alvos específicos com elevada afinidade e seletividade, pois possuem dobramento em estruturas secundárias e terciárias bem definidas (MENCIN et al., 2014). Eles formam estruturas tridimensionais caracterizadas por lopps, grampos (do inglês hairpins), triplexos, G-quadruplexos, pseudoknots, caules (do inglês stems), protuberâncias (do inglês bulges) representados na figura 5 (STOLTENBURG et al., 2007).

Figura 5- Representação esquemática de estruturas secundárias comumente observadas em aptâmeros: Hairpin (a), pseudo-nó (b), G-quadruplex (c). Adaptado de Radom et al., 2013.

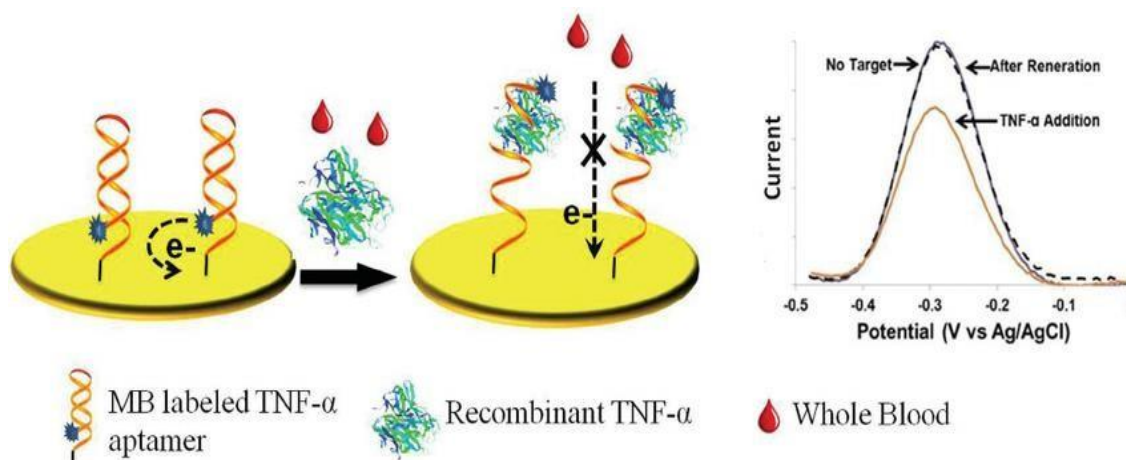


Adaptado de Radom et al., 2013.

A ligação existente entre o aptâmero e o alvo resulta da compatibilidade estrutural, empilhamento de anéis aromáticos, interações eletrostáticas e de Van de Waals, ligações de hidrogênio ou a combinação desses efeitos (STOLTENBURG et al, 2007).

A existência das mudanças conformacionais podem se dar na presença do alvo como também na formação do complexo de ligação, em que os sítios de ligação podem ser específicos na estrutura tridimensional, como apresentada na figura 6, a interação entre o aptâmero e seus alvos (HERMANN e PATEL 2000).

Figura 6- Representação esquemática da formação do complexo aptâmero-alvo.



Adaptado de: Liu et al., 2014.

Esquema da montagem do complexo aptâmero-alvo.

Quando comparados com anticorpos monoclonais os oligonucleotídeos podem gerar uma variedade de alvos, podemos incluir os compostos tóxicos e moléculas não imunogênicas, para as quais os anticorpos não podem ser gerados. São de dez a cem vezes menores que os anticorpos e não são imunogênicos, o que os diferencia como uma característica importante para o desenvolvimento de agentes diagnósticos e terapêuticos (JAYASENA 1999; MISSAILIDIS e HARDY 2009).

É crescente a aplicabilidade dos aptâmeros para o diagnóstico e tratamentos de doenças como o câncer (HERR et al., 2006; MARAGONI et al., 2015; WU et al., 2015) e infecções virais por HIV (ZHOU e ROSSI 2011; DUCLAIR 2015), dengue (FLETCHER et al., 2010; BRUNO et al., 2012; CNOSSEN 2014; SILVA 2015; CHEN et al., 2015), dentre outras.

2.5.1 A TÉCNICA DE SELEX

A técnica de Selex quer dizer: (do inglês “Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment”) (TUERK e GOLD 1990), empregada para obtenção de aptâmeros. Que ocorre por meio de uma biblioteca de sequências de fita simples de nucleotídeos aleatórios (DNA ou RNA) como uma diversidade entre 10^{12} - 10^{15} sequências diferentes. A constituição da biblioteca é por meio de uma região aleatória (20-80 nucleotídeos) flanqueada por uma região conservada. A região conservada permite a ligação de iniciadores específicos para uma reação de PCR (do inglês “Polimerase Chain Reaction”) (STOLTENBURG et al, 2007; BANERJEE e NILSEN-HAMILTON 2013). Contudo, o processo SELEX tem por finalidade etapas

repetitivas com intuito de selecionar sequências com maior afinidade de ligação com o alvo, para cada ciclo completo é denominado round (SYED e PERVAIZ 2010).

A identificação das características dos aptâmeros ocorre por vários ensaios físicos, químicos e biológicos, (SONG et al., 2012). Os parâmetros de seleção podem ser facilmente manipulados para obtenção de aptâmeros mais eficientes para uma ampla gama de condições (PH, temperatura ou a composição do tampão) (RADOM et al., 2013).

A aplicabilidade dos aptâmeros é ampla devido as suas propriedades de alta afinidade e especificidade, facilidade para modificação química e produção in vitro, além das vantagens sobre os anticorpos, que vão desde a pesquisa básica na área médica e farmacêutica e no desenvolvimento de drogas em diagnóstico e terapia.

Os aptâmeros apresentam vantagens como alta especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e facilidade na análise dos resultados, um grande potencial como agentes diagnósticos. Devido as suas propriedades, a detecção de toxinas, drogas, metabólitos, patógenos pode ser possível em baixas concentrações. Diferentes métodos de diagnóstico têm sido estudados, destacamos o uso de sensores eletroquímicos (RADOM et al, 2013).

Os aptamêros estão sendo cada vez mais empregados como receptores favoráveis para a construção de biossensores altamente sensíveis, devido suas notáveis afinidades em relação a certos alvos, incluindo um amplo espectro de substâncias biológicas ou químicas, e sua superioridade sobre outros receptores biológicos. A integralidade exercida pela seletividade e afinidade dos aptâmeros aos ensaios design práticos com aplicação de modificações adequadas, como nanomateriais na superfície do eletrodo, empregando estratégias de amplificação específicas de oligonucleótidos ou as suas combinações.

Os sensores eletroquímicos confere bastante eficaz para aplicações biomédicas, o setor de alimentos com sua implicação direta para a saúde humana, que exige soluções analíticas rápidas e sensíveis e econômicas para determinação de contaminantes que ameaçam a saúde em todas as etapas do processo produtivo. Com isso a ciência ganha na utilização de sensores eletroquímicos por apresentar também uma maior sensibilidade além de baixo custo, este tipo de sensor o aptâmero é imobilizado em um suporte condutor (SWENSEN et al., 2009).

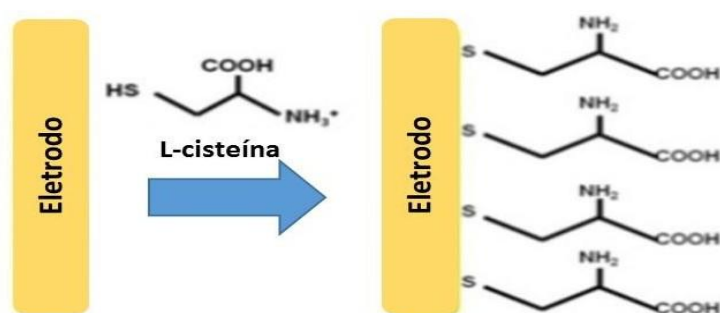
2.6 MODIFICAÇÕES DA SUPERFÍCIE SENSORA

2.6.1 CISTEÍNA (CYS)

A cisteína é um aminoácido que apresenta um grupamento tiol na sua estrutura química, como mostrado na figura 10, o que favorece a adsorção física em uma superfície de ouro

permitindo a formação de uma camada automontada. A camada de Cys pode ser empregada como um sítio para imobilização covalente de diversas biomoléculas de interesse no estudo de biossensores. Esta imobilização que ocorre entre as moléculas é covalente e guiada pelo uso de agentes ativadores como EDC e NHS que permitem a formação de uma ligação química do tipo amida (GANJI 2008).

Figura 7. Estrutura química da molécula de cisteína e camada auto-montada em superfície de ouro.



Fonte: Adaptado de Simão et al., 2016.

Camadas de Cys também permitem o ancoramento de nanoestruturas como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono permitindo a construção de um sistema sensor (LEHNINGER 2002).

Alguns trabalhos se destacam no uso de Cys para o desenvolvimento de sensores, dentre estes o realizado por Simão e colaboradores em 2016, que desenvolveram um biossensor baseado em monocamada de Cys e anticorpo monoclonal para detecção de Aflatoxina B1 em Arroz. Este sensor obteve uma excelente cobertura superficial, e capacidade de interagir com AFLA B1 apresentando um limite de detecção entre 0,75 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que demonstrou ser uma ferramenta promissora para detecção de AFB1 em arroz com sensibilidade e especificidade.

Desta forma, nosso grupo de pesquisa vem adotando o emprego da cisteína como uma alternativa útil e promissora para a construção de plataformas sensoras de relevância em imunossensores e genossensores.

2.6.2 NANOTUBOS DE CARBONO (NTC)

O carbono já é bastante empregado na confecção de eletrodos, pois apresenta condutividade elétrica, estabilidade térmica e química além de facilidade de manuseio.

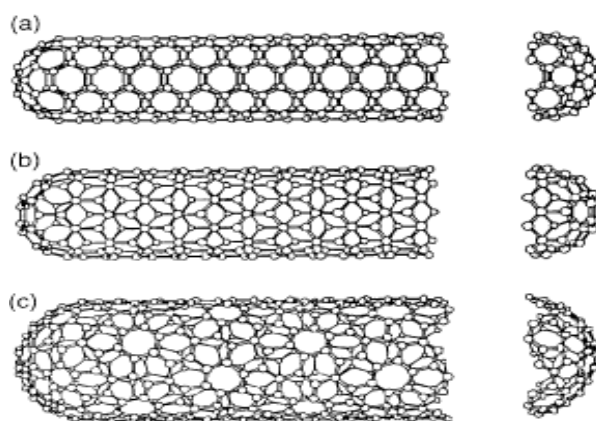
Os nanotubos de carbono (NTC) são a forma alotrópica do carbono, sendo crescente sua utilização na eletroquímica e eletroanalítica (MOOREET al., 2004; KOENHE et al., 2004), tem formato de longos cilindros que se encontram ligados covalentemente, podendo ser sintetizados por: descarga em arco elétrico, ablação por laser e deposição química de vapor que origina os dois tipos de nanotubos: Nanotubos de Carbono de Parede Simples (SWCNTs) e os Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (MWCNTs) (DAÍ 2001; ALKIRE et al., 2009).

Os NTCs apresentam uma reatividade maior quando comparados aos outros alótropos do carbono, devido à curvatura da superfície na estrutura do carbono principalmente quando as extremidades estiverem fechadas. Isso ocorre quando os NTCs são submetidos a um tratamento com ácidos ou cetonas fornecendo em suas extremidades ácidos carboxílicos e cetonas nas extremidades (ZHANG et al., 2003).

Com isso permite o aumento da cinética de transferência de elétrons ou contribuir nos processos de adsorção que pode aumentar ou diminuir a cinética de transferência de elétrons e da atividade eletrocatalítica por apresentar flexibilidade das modificações de superfície associado a resistência a tensões externas, sua geometria classifica como sistemas unidimensionais (FAGAN, 2003).

Na figura 8 são apresentadas as formas geométricas dos NTCs que são descritos teoricamente enrolando numa folha de grafeno que pode ocorrer de três formas (armchair, zigzag e quiral) (SAITO et al., 1992).

Figura 8. Estrutura dos NTC: (a) armchair, (b) zig zag, (c) quiral.



Outra vantagem do emprego de NTCs é a elevada área superficial que fornece o aumento das correntes eletroquímicas nas espécies eletroativas, também permite que enzimas, anticorpos, antígenos sejam imobilizados em sua estrutura (BANERJEE et al., 2005). A modificação existente na superfície dos NTCs gera inúmeras possibilidades para o desenvolvimento de novos dispositivos.

Os NTCs podem ser funcionalizados por dois métodos: método não covalente, a funcionalização pode ser feita por meio de interação do tipo van der Waals com uso de surfactantes (O'CONNEL, LARS e CHAD 2001), peptídeos (RICHARD, BELAVOINE e MIOSKOWSKI 2003) e polissacarídeos (DOHI e KIKUCHI 2006). A interação física que ocorre nesse método preserva as propriedades eletrônicas e a aromaticidade do NTC. Pelo método covalente ocorre uma maior reatividade pela tensão a que os carbonos estão sujeitos a partir dessa funcionalização inicial. Nas paredes dos NTCs possa ligar-se a uma infinidade de moléculas (ISLAM e ROJAS 2003).

Em 2006 Roma avaliou a interação dos NTCs com aminoácidos e comprovou que adsorção das moléculas de aminoácidos na parede do NTC pode perturbar o arranjo ordenado dos átomos, alterando as propriedades físicas do sistema e possibilitando que outras características possam ser observadas (ROMAN 2006).

Como principal aspecto para que a inserção dos nanotubos ocorra é devido às características adequadas que esse material apresenta para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos como: alta velocidade na transferência de elétrons, alta área superficial e presença de grupos funcionais, que fazem com que os nanotubos de carbono sejam desejáveis para a modificação com diversos tipos de espécies (enzimas, material genético, complexos metálicos, entre outros) que podem ser incorporadas melhorando ainda mais a transferência de elétrons, entre analito e eletrodo, possibilitando a obtenção de uma boa resposta em pouco tempo.

Um dos primeiros trabalhos com a utilização de nanotubos de carbono teve como objetivo de avaliar o comportamento oxidativo da dopamina através da eletroanálise (BRITO et al., 1996). O crescente interesse pela utilização de nanotubos se deu a partir de 2002, quando Joseph Wang et al., desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono para detecção de NADH, que apresentou uma excelente resposta eletrocatalítica e

alta estabilidade, permitindo assim a detecção amperométrica altamente sensível de NADH (WANG et al.,2002).

É crescente a aplicação de NTC no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para detecção de toxinas alimentares, podemos citar o trabalho de Lei e colaboradores em 2006 empregaram nanotubos de carbono para detecção de ocratoxina A com limite de 17,2 ng/mL, como também Singh et al., 2013 desenvolveram um biossensor baseado em nanotubos de carbono em ITO para identificação de AFB1 com limite de detecção de 0.08 ng/mL.

O emprego de nanopartículas como as nanopartículas de óxido de zinco acopladas aos nanotubos na confecção de sensores é de suma importância para aumentar a área de superfície para imobilização de biomoléculas e melhoria na sensibilidade e desempenho analítico.

2.6.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO (ZNONPS)

A empregabilidade do óxido de zinco é crescente por possuir estabilidade química exibindo um grau significativo de seletividade a substâncias tóxicas (PATEL et al., 2016),possuem uma notoriedade devido as estabilidades físicas e químicas, alta capacidade oxidativa e largura de banda proibida na região UV ou visível no espectro eletromagnético, baixo custo, alta disponibilidade e baixa toxicidade (SEONGPIL et al.,2014), além da biocompatibilidade expressiva, induzindo respostas específicas em detrimento do seu uso (AUDE-GARCÍA et al.,2016).

O óxido de zinco (ZnO) é um tipo de semicondutor (3,37 eV), com propriedades elétricas significativas (60 meV) (NAI-FENG et al., 2014). Além disso, atesta estabilidade em longo prazo, alta sensibilidade e confere provável aumento do sinal eletroquímico (SALINH et al., 2016) garantindo sua aplicação em biossensores.

Os óxidos de metais nanoestruturados vêm chamando muita atenção devido às suas interessantes propriedades de superfícies dependentes de: tamanho eletro-analítico, piezoelétrico, fotônico que tornam atraente para aplicações de biossensores. Neste contexto óxido de zinco têm sido utilizados para imobilização de proteínas, enzimas e antígenos para transferência acelerada de elétrons entre biomoléculas e eletrodos imobilizados desejados.

Esses destacam por ser nanomateriais com propriedades de grande interesse pelo fato de possuir grande relação superfície-volume, alta atividade de reação superficial, alta eficiência catalítica e forte capacidade de adsorção que os tornam potenciais candidatos a desempenhar um papel catalítico na fabricação de imunossensores (ANESS et al., 2009).

Dentre alguns sensores de óxido de zinco podemos destacar o uso de ZnONPs para detecção de antígeno do câncer ovariano (GASPAROTTO et al., 2017), para imunodeteção de cortisol (VABINA et al., 2015) avaliação dos níveis de dopamina (FOODAZAS et al., 2012). Em adição, a literatura também demonstra o uso de ZnONPs no desenvolvimento de aptasensores, como por exemplo aptasensor para trombina uma importante proteína a envolvida nos processos de coagulação sanguínea (EVTUGYN et al., 2013).

3 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

O crescente interesse em métodos eletroquímicos é devido ao seu baixo custo e, principalmente, por possibilitar o uso de eletrodos quimicamente modificados. Além de fornecer uma maior sensibilidade, aplicabilidade e estabilidade para o sistema em estudo, quando comparados com eletrodos não modificados (PEREIRA et al., 2002; FREIRE et al., 2006). Dentre os métodos eletroquímicos destacam-se a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica.

3.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA (VC)

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica pelo qual as informações qualitativas e quantitativas de um analito obtido por meio da corrente em função do potencial aplicado que deve ser alto para ultrapassar todas as barreiras de energia, *i.e* queda ôhmica, polarização de concentração devido a difusão e cinética de transferência eletrônica serem lentas entre outras na interface eletrodo/solução. É caracterizada por ser uma técnica dinâmica, pois é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que é medida pela função controlada do potencial (SKOOG et al., 2002).

Por meio da técnica podemos tomar conhecimento com relação à reversibilidade eletroquímica de um sistema, que esteja associado à troca rápida de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo (QUINTINO 2003). O princípio de funcionamento da VC é devido à resposta de corrente ao aplicar um sinal de excitação de um potencial alto ou baixo que será determinado pelo tipo de analito em estudo. O resultado é expresso como corrente em função do potencial.

No geral, o sistema é formado por três eletrodos: eletrodo de trabalho, de referência e auxiliar, onde o eletrodo de trabalho é polarizado e o potencial é medido em função do eletrodo de referência não polarizável e o fluxo de corrente ocorre entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar (SKOOG et al., 2002). A forma da perturbação do eletrodo, pela aplicação de diferentes programações de potenciais, define a natureza da técnica voltamétrica (MARINHO 2010).

Como resultado da corrente em função do potencial é obtido o voltamograma. A magnitude da corrente, devido a transferência de elétrons durante um processo de oxirredução, (Equação 1), é proporcional a quantidade de analito presente na interface do eletrodo (WANG 2001; SKOOG et al., 2002).



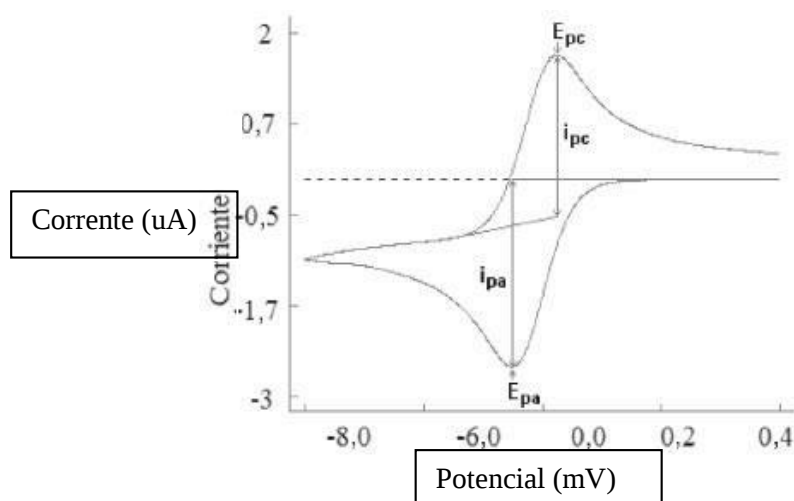
A aplicação do potencial leva a polarização da superfície eletródica com formação da dupla camada. Os analitos de carga oposta são atraídos à interface por migração e os analitos neutros são atraídos por difusão podendo ser também por adsorção. O transporte de massa pode ser por migração que sofre influência 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).

É imprescindível a escolha do eletrodo para o desempenho da técnica voltamétrica, nomeadamente na construção de biossensores. O desenvolvimento de eletrodos de trabalho quimicamente modificados veio minimizar várias limitações que os sensores eletroquímicos que apresentavam a passivação gradual da sua superfície, a cinética de transferência de elétrons entre os analitos e os materiais dos eletrodos serem demasiadamente lentos e a dificuldade em discriminar entre compostos alvos que possuam características de oxidação-redução similares (FREIRE et al., 2002).

A aplicação do potencial na voltametria cíclica ocorre linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho, em uma solução sem agitação. Dependendo do objetivo da informação pode ser simples ou múltiplos ciclos utilizados (VIEIRA et al., 2011).

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 (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), e a corrente de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) (WANG, 2001; SKOOG et al., 2002).

Figura 9 - Representação gráfica da Voltametria Cíclica.



Fonte: Adaptado pelo autor.

A avaliação dos parâmetros anódicos e catódicos caracterizam a técnica de VC como uma ferramenta que nos fornece informações da interface do eletrodo modificado biologicamente, permitindo deste modo o acompanhamento da taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a solução que o rodeia (YANG et al, 2001). Estes processos de modificação da taxa de transferência de elétrons foram avaliados nos sensores desenvolvidos nesta tese para a AFB1 e OTA.

O emprego da VC é fundamental importância para o desenvolvimento de cada etapa do sensor, devido a sensibilidade e a possibilidade de avaliar e visualizar diversas interações que ocorrem entre as moléculas na superfície do eletrodo.

3.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIE)

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica pode ser definida como uma técnica que atua na caracterização da interface eletrodo-solução, apresentando sensibilidade a fenômenos de superfície como também as propriedades dielétricas do meio. Com isso a EIE torna-se importante técnica aplicada na área de biossensores empregadas na detecção da ligação entre o elemento de reconhecimento do sensor e o analito (PANKE et al., 2008; LISDAT and SCHAFER 2008).

Esta técnica é utilizada para descrever a resposta de sistemas que são constituídos por capacitâncias, resistências e indutâncias. Através das medidas de impedância e ângulo fase há possibilidade de avaliar processos como transporte de carga incluindo a velocidade de

transferência, condutividade de filmes, capacitância redox e dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, dentre outros (JIANG et al., 2000).

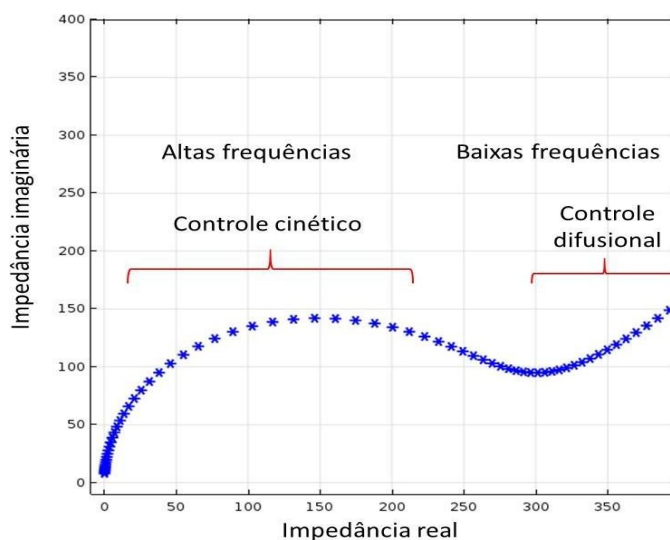
É importante em imunossensores, pois auxilia no melhoramento da transferência de elétrons que ocorre durante o processo de interação antígeno/anticorpo. Esta técnica oferece diversas vantagens tais como baixo custo, sensibilidade aumentada, rapidez e facilidade de instrumentação. A determinação do sistema é feita com o registro da corrente em resposta à aplicação de uma tensão sinusoidal de baixa amplitude (geralmente 5-250 mV).

A impedância (Z) pode ser definida como o quociente entre a tensão aplicada (V) e a corrente gerada (I) em função do tempo (t) (BERGGREN et al., 2001; PANKE et al 2008; LISDAT e SCHAFER et al., 2008). A EIE pode ser expressa pelo seu módulo ($|Z|$), desvio do ângulo de fase ou pela sua parte imaginária e parte real (Figura 10) (BERGGREN et al., 2001; PANKE et al., 2008). Além disso, f é a frequência (Hz), ϕ é o ângulo do desvio de fase ($^\circ$) entre a tensão $V(t)$ e a corrente $I(t)$. Em adição, há a $\tan(\phi)$ que se refere a tangente de perdas. Através das medidas de impedância e ângulo fase há possibilidade de avaliar processos como transporte de carga incluindo a velocidade de transferência, condutividade de filmes, capacitância redox e dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, dentre outros (JIANG et al., 2000).

Por meio de modelos matemáticos ou circuitos equivalentes são obtidos os dados referentes a EIE. O emprego desses circuitos permite a simulação do comportamento eletroquímica em termos dos componentes de um circuito convencional. Vários estudos eletroquímicos empregam a EIE como cinética do eletrodo, estudos de dupla camada, processos em bateria, investigação sobre processos de corrosão, eletroquímica em estado sólido e bioeletroquímica (FEY et al., 2003; WANG et al., 2001; SALKING et al., 2003; CHENG et al., 2000).

A importância da utilização da EIE como técnica analítica para validação do imunossensor como também sua sensibilidade frente a toxina B1, pois é uma técnica importante para o desenvolvimento de imunossensores são caracterizados por apresentar alta sensibilidade, baixo custo e resposta rápida.

Figura 10- Representação esquemática do diagrama da impedância de Nyquist.



Fonte: Adaptada pelo autor.

Para extrair informações dos dados de impedância são utilizados diferentes circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. A aplicabilidade dos circuitos equivalentes permite simular o comportamento da célula eletroquímica em termos dos componentes de um circuito convencional.

A EIE vem sendo aplicada em vários estudos eletroquímicos tais como cinética do eletrodo, estudos de dupla camada, processos em bateria, investigação sobre processos de corrosão, eletroquímica em estado sólido e bioeletroquímica (FEY et al., 2003; WANG et al., 2001; SALKIND et al., 2003; CHENG et al., 2000). Aplicação analítica tem crescido em investigações de hibridização de oligômeros de DNA, por meio do acompanhamento da impedância total do sistema. Esta análise só é possível porque a impedância total do sistema está associada ao aumento do componente capacitivo do sistema, como resultado de mudanças na densidade e mobilidade de íons associados com a reação de hibridização (GUISEPPE-ELIE et al., 2004).

Recentemente Yagati e colaboradores em 2018, construíram um sensor baseado em análises impedimétricas, sem uso de marcador para a detecção de Aflatoxina B1. Em adição, Castillo et al em 2015, desenvolveram um biossensor impedimétrico utilizando dendrímeros baseado em DNA-aptâmero para detecção de micotoxinas em amostras amendoim.

Neste sistema a avaliação das componentes real e imaginária da impedância foram essenciais para a avaliação matemática do processo de obtenção do sensor e avaliação do processo de bioreconhecimento.

3.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

As análises de microscopia de força atômica são mediadas por deflexões de um suporte (de 100 a 200 cm de comprimento) em cuja extremidade livre está montada a sonda. Estas deflexões são causadas pelas forças que agem entre a sonda e amostra. Os modos de fazer as imagens, também chamados modos de varredura ou de operação, referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a sonda (ponteira) e amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. A análise da superfície é realizada visando à criação de uma imagem.

São contínuos os modos possíveis de fazer imagens, devido às diferentes interações em função da distância entre a ponteira e a amostra, assim como ao esquema de detecção utilizado. A escolha do modo apropriado depende da aplicação específica que se deseja fazer. As diferentes técnicas fornecem diversas possibilidades para fazer imagens de diferentes tipos de amostras e para gerar uma ampla gama de informações.

A qualidade das imagens e o modo de operação dependem de diversos fatores como, os materiais que compõem a amostra e a ponteira, a distância entre elas, a geometria da ponteira e de qualquer tipo de contaminação que houver sobre a superfície da amostra (HOWLAND et al 1996). Quando a ponteira se aproxima da amostra, inicialmente é atraída pela superfície, devido a uma ampla gama de forças atrativas existentes na região, como as forças de Van der Waals.

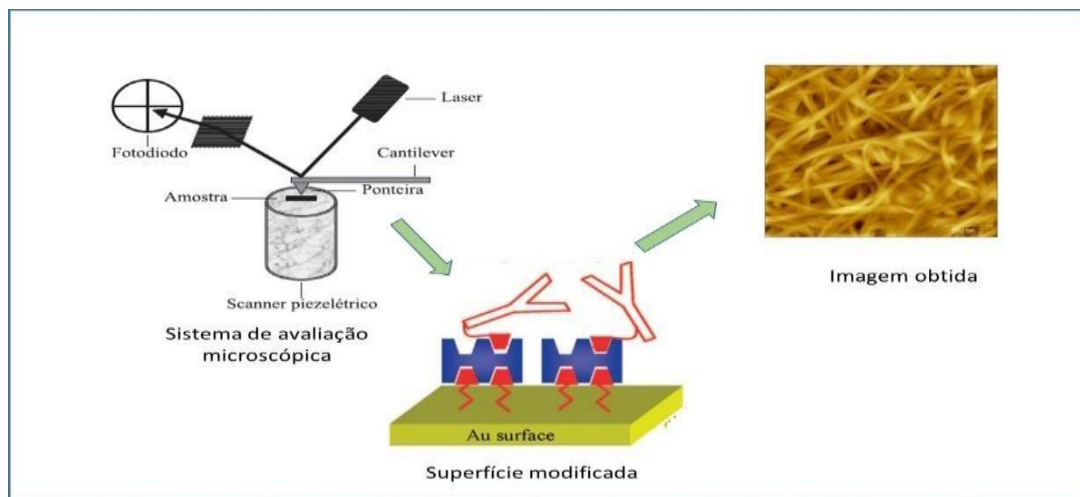
Esta atração tende a aumentar até o ponto de a ponteira aproximar-se muito da amostra, desta forma, os átomos de ambas estão tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir. Esta repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa à medida que a distância diminui. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns ângstrons (ordem da distância característica de uma união química).

Quando as forças se tornam positivas, podemos dizer que os átomos da ponteira e da amostra estão em contato e as forças repulsivas acabam por dominar. (WORCESTER et al.,1988). A figura 11 ilustra as etapas para obtenção de imagem por meio do microscópio de Força Atômica.

As análises do tipo não contato prevalece nos estudos de superfícies sensoras. Neste sentido, o processo de avaliação vai ser determinado pelos arranjos e modificações prévias realizadas para a obtenção da camada de ligação e por fim o ensaio de biointeação via anticorpo-antígeno

ou outro processo bioquímico dominante que se queira avaliar (sonda-DNA, hormônio-receptor, lectina-carboidrato, peptídeo-bactéria, aptâmero-substrato, etc).

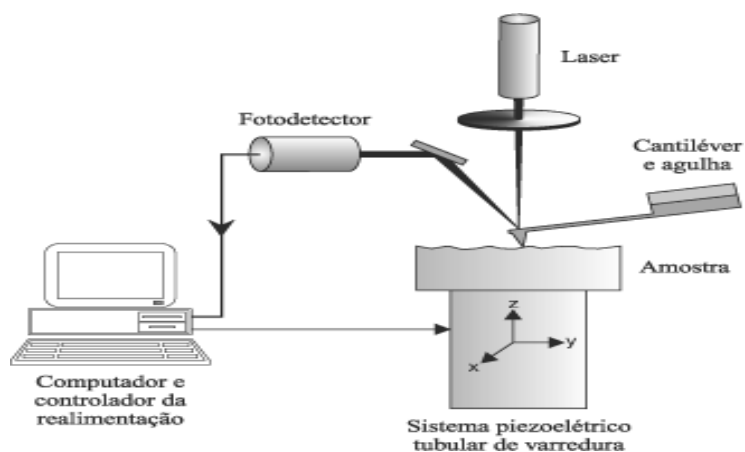
Figura 11- Princípio de funcionamento do microscópio de Força Atômica.



Fonte: Adptada pelo autor

A Figura 12 ilustra a variação de força em função da distância de separação a partir da interação entre ponta e amostra. As forças envolvidas no funcionamento do AFM são do tipo *van der Waals* (MAGNOV et al 1996).

Figura 12- Gráfico de força interatômica vs. distância entre a sonda e a amostra (extraída de Dotto 2003).



Os substratos mais comumente empregados nos estudos com AFM são vidro, mica e substratos à base de silício, que podem apresentar um filme metálico sobre a superfície. A superfície de mica é comumente utilizada para obtenção de imagens topográficas de proteínas

por AFM devido ao caráter hidrofílico, ao fato de ser atômicamente plano e de possuir alta afinidade por moléculas bioquímicas.

Para estudo de amostras biológicas é importante encontrar o método adequado de imobilização das moléculas no substrato e que não cause alteração estrutural do sistema. Vários trabalhos, envolvendo a modificação química de superfícies e imobilização de moléculas, foram desenvolvidos para obtenção de imagens topográficas de alta resolução da interação de sonda-alvo de DNA com a técnica de AFM, através do monitoramento direto (FERREIRA e YAMANAKA, 2006). Pode-se observar que a partir das imagens topográficas é possível observar o número de interações entre as moléculas que interagem por meio de hibridização, avaliação de interações específicas e não específicas.

Desta forma, o AFM vem sendo utilizado como uma ferramenta útil no estudo de superfícies modificadas com o intuito de observar biointeração do tipo antígenoanticorpo, proteína-carboidrato, hibridização de fitas de DNA e morfologia associado aos processos de modificação. A microscopia de força atômica para sensores eletroquímicos é de grande valia para avaliação da topografia das superfícies demonstrando ser uma etapa importante para monitoramento do processo de modificação etapa por etapa, seja por eventos de adsorção física como por adsorção química.

Manuscript Number:

Title: APTAMER-BASED ELECTROCHEMICAL NANOBIOSENSOR FOR DETECTING OCHRATOXIN A IN ROASTED COFFEE

Article Type: Full Length Article

Keywords: aptasensor; ochratoxin A; carbon nanotube; zinc oxide; electrochemical impedance spectroscopy

Corresponding Author: Professor Maria Danielly Danielly Lima de Oliveira, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco

First Author: Maurília P Costa

Order of Authors: Maurília P Costa; Itala G Lima; Idjane S Oliveira; Cesar A Andrade; Maria Danielly Danielly Lima de Oliveira, Ph.D

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: In this work, we developed an electrochemical aptasensor for detecting ochratoxin A (OTA) in ground and roasted coffee samples. Carbon nanotubes (CNT) show excellent employability due to their biocompatibility and low cost to the development of electrochemistry platforms. Zinc oxide nanoparticles (ZnO) have been extensively used due to their physicochemical properties, high oxidative capacity, low cost, high availability and low toxicity. The proposed biosensor consists of a self-assembled cysteine layer covalently bonding to carboxylic acid-functionalized carbon nanotubes and subsequently ZnO and aptamers. An increase in the impedimetric response was observed after exposure to samples containing OTA due to the interaction between aptasensor and mycotoxin. The resistance charge transfer (R_{ct}) increase proportionally to OTA concentrations. As a result, a reduced detection limit (LOD) of 0.5 pg.mL⁻¹ and a linear range of 1.0 pg.mL⁻¹ to 100 pg.mL⁻¹ were found. The topographic images of the different biosensor surfaces were evaluated by atomic force microscopy with notable changes after surface modifications. Also, R_{ct} values from Cys-CNT-ZnO-biosensor revealed no changes after aflatoxin B1, patulin, and aflatoxin mix (B1, B2, G1, and G2) exposition. In addition, the proposed device was capable of detecting OTA in contaminated ground and roasted coffee samples. The good analytical performance of the biosensor provides a simple assembly instrument that can be used for monitoring of the OTA.

corawon@chula.ac.th
Expertise in biosensors.

Yuanzhong A Chen
Professor, Department of Pharmaceutical Analysis, Fujian Medical
University
chenyz@pub3.fz.fj.cn
Expertise in biosensors.

Shijia A Ding
Professor, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical
University
dingshijia@163.com
Expertise in biosensors.

Opposed Reviewers:

APTAMER-BASED ELECTROCHEMICAL NANOBIOSENSOR FOR DETECTING OCHRATOXIN A IN ROASTED COFFEE

Maurília P. Costa¹, Itala G. T. Lima², Idjane S. Oliveira³,
Cesar A.S. Andrade^{1, 2}, Maria D. L. Oliveira^{1, 2}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

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

³Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

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

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

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

In this work, we developed an electrochemical aptasensor for detecting ochratoxin A (OTA) in ground and roasted coffee samples. Carbon nanotubes (CNT) show excellent employability due to their biocompatibility and low cost to the development of electrochemistry platforms. Zinc oxide nanoparticles (ZnO) have been extensively used due to their physicochemical properties, high oxidative capacity, low cost, high availability and low toxicity. The proposed biosensor consists of a self-assembled cysteine layer covalently bonding to carboxylic acid-functionalized carbon nanotubes and subsequently ZnO and aptamers. An increase in the impedimetric response was observed after exposure to samples containing OTA due to the interaction between aptasensor and mycotoxin. The resistance charge transfer (R_{ct}) increase proportionally to OTA concentrations. As a result, a reduced detection limit (LOD) of 0.5 pg.mL^{-1} and a linear range of 1.0 pg.mL^{-1} to 100 pg.mL^{-1} were found. The topographic images of the different biosensor surfaces were evaluated by atomic force microscopy with notable changes after surface modifications. Also, R_{ct} values from Cys-CNT-ZnO-biosensor revealed no changes after aflatoxin B1, patulin, and aflatoxin mix (B1, B2, G1, and G2) exposition. In addition, the proposed device was capable of detecting OTA in contaminated ground and roasted coffee samples. The good analytical performance of the biosensor provides a simple assembly instrument that can be used for monitoring of the OTA.

Keywords: aptasensor; ochratoxin A; carbon nanotube; zinc oxide; electrochemical impedance spectroscopy

1. Introduction

According to the International Coffee Organization, diverse factors such as inadequate transport, humidity and temperature are favorable to fungal growth and proliferation of Ochratoxin A (OTA) [1]. OTA is a mycotoxin produced by fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. Of note, OTA represents one of the most prevalent mycotoxins in the contamination of the agricultural products causing health risks [1, 2]

According to International Agency for Research on Cancer (IARC), OTA is classified in the group 2B that indicates a possible carcinogenic action for humans, mutagenic effects, teratogenic and immunosuppressive activities. In addition, OTA has been shown nephrotoxic action associated with a renal disease known as Balkan nephropathy [3]. OTA is considered a public health problem because affects infants and young children due to their diet [4].

OTA has been detected in essential products for daily human consumption as grape, coffee, oats, wheat, corn, rice, barley, infant food, cocoa, among others [3, 5-8] The process of contamination can still occur in the field from the improper handling of the equipment used to process the food. In addition, a favorable environment to fungus growth is obtained during inadequate transport and/or storage [1].

The European Union has established a tolerable weekly intake of 120 ng of OTA per kg of body weight (Commission Regulation No. 594/2012)[9]. The presence of OTA at high levels in coffee has been observed around the world [5, 10, 11]. Thus, it is important to develop new detection methods increasingly precise, fast and at a lower cost, aiming to reduce socioeconomic impacts that a world food such as coffee causes if its production is affected.

Immunoassay test requires labeling, laborious washing, and based on a competitive reaction to detect small molecules such as OTA. However, their sensitivity is lower than it would be for a noncompetitive reaction [12]. Also, a wide range of commercial enzyme-linked immunosorbent assays are available in the market, but this technique provides many false positives and false negatives [13]. New alternatives are important to guarantee sensibility and adequate detection of OTA.

Aptamers are an excellent alternative for the development of sensor platforms since they present greater stability as compared with antibodies [14]. Aptamers are constituted by an artificial single-stranded nucleic acid with an affinity for targets as proteins, cells, small ions and molecules [15]. Currently, aptamer-based biosensors (so-called aptasensors) include colorimetric [16] and electrochemical aptasensors [17, 18].

The modification of an electrochemical surface is essential for the construction of a biosensor. The association of molecules and nanostructures has been commonly used for immobilization

of biomolecules in the electrochemical sensors. Cysteine (Cys) molecules associated with nanoparticles and carbon nanotubes are important to ensure efficiency for bio-recognition processes. Carbon nanotubes (NTCs) are widely used in the development of high-performance electrochemical sensors due to their high chemical stability, electrical conductivity, and mechanical strength, in addition to extremely high stiffness [19]. Zinc oxide (ZnO) corresponds to a metal oxide nanoparticle with chemical stability and a significant degree of selectivity to toxic substances [20]. ZnO nanostructures are notable due to physical and chemical stabilities as high oxidative capacity, low cost, high availability and low toxicity [21-23]. The ZnO is a type of semiconductor (3.37eV) with significant electrical properties (60 meV) [24]. Also, ZnO shows long-term stability, high sensitivity and increase the electrochemical signal [25].

Biosensors represent a future trend in the detection of mycotoxins in a wide variety of food matrices [26] because of their potential for incorporation into portable devices. For detection of OTA, electrochemistry [27-32] is considered one of the most appropriate techniques for applications is considered to be the most abundant, at the same time they are capable of higher sensitivities of low-cost detection and mainly by enabling the use of chemically modified electrodes. Providing greater sensitivity, applicability, and stability for the system being studied when compared to unmodified electrodes [33]. Our strategy to detect OTA is based on cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The proposed electrochemical system is quick to build and stands out as a highly sensitive monitoring biosensor for OTA as compared to immunoassays. The biodevice can be used to monitor coffee quality and helping farmers to increase the yield of current storage methods. To our best knowledge, this study is the first report using CNTs, ZnONPs and aptamer probe to identify OTA in coffee samples.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide $K_4 [Fe(CN)_6]/K_3 [Fe(CN)_6]$ were obtained from VETEC (Brazil). 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), multiwall CNT, cysteine, aflatoxin B1, ochratoxin A (OTA), (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES), anhydrous toluene, nitric acid and tetramethylammonium hydroxide (TMAOH) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Sakai Chemical Industry provide ultrafine ZnO powder. The OTA aptamers (OTAapt) used were purchased from Integrated DNA Technologies (USA). The aptamer sequence was R-5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA-3'. All other

reagents were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received, without further purification.

2.2. *Electrochemical measurements*

EIS and CV measurements were performed on a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands). CV measurements were performed at 50 mV.s⁻¹ scan rate with a potential scan range from -0.2 to 0.7 V. EIS measurements were performed in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz. The amplitude of the applied sinusoidal wave potential was 10 mV relative to the Ag / AgCl reference electrode. Electrochemical data and fitting were obtained using NOVA software (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands). The modified gold electrode was used as working electrode. The platinum wire and Ag/AgCl saturated with KCl were used as counter electrode and reference, respectively. Electrochemical measurements were performed in the presence of 10 mM K₄ [Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] (1:1) solution (used as a redox probe) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4).

2.3 *Topographical characterization*

The surface morphology was characterized using non-contact mode atomic force microscope (Shimadzu SPM-9500). Cantilevers with a silicon AFM probe (Tap190Al-G, 190 kHz resonant frequency, 48 N.m⁻¹ force constant) were used for analyses at ambient conditions in air (~25°C). Lateral resolution was set to 512 × 512 pixels in a scan area of 5 × 5 μm. At least three areas in each sample were macroscopically separated for analysis.

2.4 *ZnONPs modification*

APTES was used for zinc oxide modification, as follow: 1.5 g of zinc oxide was dispersed in 50 mL distilled water with pH adjusted to 6.5 using 2M HNO₃ solution. The suspension was stirred for 1 h and then added 1 mL of APTES. The pH was increased to 9.7 due to the basic property of the amino group and stabilized to 8.9-9.2. The obtained solution was stirred for another 24 h, then the excess APTES was removed by filtration and washing with alcohol and acetone. Finally, the powder was dried at 60 ° C under vacuum [34].

2.5 *Modification of the gold electrode surface*

Initially, the bare gold electrode (BGE) was polished with 0.05 μm of α-Al₂O₃ paste, carefully washed by rinsing and ultra-sonic bath in ultrapure water for 15 min. The modification process of the Cys_NTC_ZnO_Apt-modified electrode is shown in Fig. 1. First, 15mM Cys solution (3 μL) was carefully dropped over the electrode and allowed a 15-min incubation time at 25°C to create a self-assembled layer. The electrode was set in an ultrasound bath for 1 min. Cys-CNT system was obtained by wise-dropping 2 μL of an aqueous solution containing carboxyl-CNT diluted in a 1:1 of a EDC (0.4 M):NHS (0.1 M) on cys-modified electrode, and incubated for

30 min at 25°C. Afterwards, ZnO aminated nanoparticle (2 μ L) was chemically adsorbed for 20 min to obtain Cys-NTC-ZnONPs system. Subsequently, a mixture (3 μ L) composed by EDC (0.4 M), aptamer and NHS (0.1 M) was added to the previous platform during 40 min. Finally, the remaining nonspecific sites were blocked with 1 μ L of a 10% w/v BSA solution incubated for 5 min. After this process, the aptasensor was tested against OTA samples.

2.6 Detection of OTA in coffee

The biosensing ability of the Cys-CNT-ZnONPs-Apt-modified electrode was evaluated by 2 μ L of standard solutions adjusted at different concentrations of OTA [1, 25, 50, 75 and 100 μ g.mL⁻¹]. The aptasensor was tested against 2 μ L roast ground coffee samples containing OTA [1, 25, 50, 75 and 100 μ g.mL⁻¹]. OTA was extracted from coffee samples with methanol process [35], followed by clarification through the centrifugation process. Subsequently, the supernatant was collected and evaporated [36].

3. Results and Discussion

3.1 Topographical analyses

Fig. 2 shows the surface roughness of the electrode after the assembly process. Cys molecules are organized as a self-assembled monolayer (SAM) on the gold electrode surface favored by its terminal thiol groups (Fig. 2a). Cys layer results in a surface topography with a height of 33 nm, similar to previous results [37, 38]. In addition, after CNT immobilization on Cys layer, we observed a new height of 44 nm (Fig. 2b). Fig. 2c revealed a change in the morphology of the surface after conjugation of the ZnONPs. The surface height for Cys-CNTs-ZnO and Cys-CNTs-ZnO-Apt was 61 nm and 81 nm, respectively (Fig. 2 c and d). We observed changes in the topography of the sensor system after exposure to OTA samples resulting in height $\sim$ 119 nm (Fig. 2e). In addition, non-significant differences in the morphology of the biosensor were observed after contact with Aflatoxin A (height $\sim$ 84 nm) (Fig. 2f). Therefore, our results suggest the specificity and selectivity of the sensing platform.

3.2 Electrochemical characterization

The voltammetric analysis of the assembly process is shown in Fig. 3a. We observed that the BGE signal shows a reversible voltammogram compatible with the redox probe response. A decrease in the amperometric response was observed after modifying the electrode to obtain the aptasensor. Cys layer results in a decrease of the anodic and cathodic peaks (Fig. 3a). Cys molecules have thiol groups that strongly interacts with gold by chemisorption. The presence of Cys layer on the electrode is essential for the development of nanostructured sensors. The Cys-CNTs system results in a higher oxidation and reduction peaks of the redox pair with responses similar to the BGE (data not shown). The addition of the ZnONPs on the Cys-CNTs-

modified electrode resulted in a decrease in the amperometric response. A sharp decrease in the current peaks signals (Fig. 3a) was obtained after aptamer immobilization on the Cys-CNTs-ZnONPs nanostructured platform. The extent of adsorption can be expressed in a relative percent deviation (RPD),

$$(\%) = \frac{[I_b - I_a]}{I_a} \quad (1)$$

where I_b and I_a correspond to the anodic peak current before and after the hybridization process, respectively. RPD results for Cys-CNTs-ZnONPs-Apt-modified electrode before and after the reaction with different concentrations of OTA are shown in Table 1.

We observed a reduction of the oxidation/reduction signals of the sensor after exposure to OTA samples, including separation of the anode and cathode peaks. Despite the quasi-reversible behavior observed, the obtained results suggest that the deceleration of the redox couple transfer rate is mainly operated by the amount of the surface coating. The EIS data were fitted with a Randles equivalent electrical circuit (Fig. 3b). The circuit includes the ohmic resistance of the redox probe (R_s), the Warburg (W) impedance caused by diffusion of electrolyte ions by mass to the electrode interface, a constant phase element (CPE) and resistance to charge transfer (R_{ct}). R_{ct} is related to the redox processes that occur near the surface of the electrode.

The impedimetric response of the sensor system was evaluated based on the Nyquist plots. The Cole-Cole-shaped diagrams have two distinct segments, a semicircle at higher frequencies attributed to the electron transfer, and a posterior straight line occurring at lower frequencies attributed to the process of limited diffusion electron transfer. We observed at each step of the aptasensor assembly an increase in the diameter of the Nyquist semicircle that is proportional to R_{ct} , except for CNTs.

BGE impedimetric response is mainly related to diffusion processes ($R_{ct} \sim 0.077 \text{ k}\Omega$). After obtaining the Cys-NTCs-ZnONPs-Apt nanostructured system, an increase in the impedimetric response ($R_{ct} = 0.13 \text{ k}\Omega$) was observed due to a layer shielding effect avoiding electrochemical probe transfer. An additional blocking layer was observed after contact with OTA samples, decreasing the redox probe flow.

3.3 Optimization of experimental conditions for OTA detection

To assess reproducibility and standard experimental deviation (S.D.), the following data is presented as the result of three replicates performed for each sample. We can see a gradual increase in the R_{ct} resistance from $0.13 \text{ k}\Omega$ (1 pg.mL^{-1}) to $0.509 \text{ k}\Omega$ (100 pg.mL^{-1}). The voltammetric and impedimetric responses of the aptasensor against OTA (1, 25, 50, 75 and 100 pg.mL^{-1}) are shown in Fig. 4. The scattered points represent the experimental results while the

solid black lines correspond to adjustment curves of the equivalent circuit. The equivalent circuit analysis is shown in Table 2. R_{ct} is the most sensitive parameter and, therefore, it is convenient to evaluate the interaction of the sensor with the toxin regarding the relative variation of R_{ct} , defined as:

$$\% \Delta R_{ct} = \left| \frac{R_{ct} - R_{ct}^0}{R_{ct}^0} \right| \times 100, \quad (2)$$

R_{ct}^0 and R_{ct} correspond to the biosensor response before and after interaction with OTA, respectively. The relationship between $\Delta R_{ct}\%$ and OTA concentration is shown in Fig. 5a.

The target surface coverage (θ), which is associated to the filling of the recognition sites, can be calculated by: $\theta = 1 - \frac{R_{ct}}{R_{ct}^0}$ (3)

where R_{ct} is the charge transfer resistance for Cys-NTCs-ZnONPs-Apt system, and R_{ct}^0 is the charge transfer resistance obtained after recognition of different OTA concentrations. Fig. 5b shows a plot of θ as a function of the OTA concentration. The θ value increases with increasing OTA concentration and is found to be 0.70 (70%) of the 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.4 Sensor Selectivity

Selectivity was assessed by testing the sensor towards roasted coffee samples contaminated with OTA for positive samples and aflatoxins B1, B2, G1, G2, and Patulin as negative samples. These mycotoxins have in common carcinogenic properties, lesions in the organs, and induce suppression in the immune system [3].

No significant response was observed after the interactions of aflatoxins B1, B2, G1, G2, and Patulin at a concentration of 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Table 2). Of note, these toxins does not interfere with the system's ability to OTA detection.

3.5 OTA detection in roasted coffee samples

Tests were performed to validate the proposed platform for OTA detection in roasted coffee samples. According to EU, the tolerable limit is 120 ng OTA per kg of body weight ingested per week [9]. The obtained values present values of standard deviation (less than 1%), indicating the validation of the developed sensor. The analytical results ($R_{ct}\%$) for the OTA recognition in roasted coffee samples are presented in Fig. 6.

Some reports using aptamers and analytical methods to detect Ochratoxin A are available and demonstrated both the good sensitivity and dynamic range of the electrochemical aptasensor of this research [39-42]. The developed system is simple, fast and low cost. Aptamer-CNT-based transducers are relatively easy and fast to construct. The presented Impedimetric strategy associated with carbon nanotubes allowed a specific evaluation without

a chemical label. Also, Cys layer was capable of permitting CNT and ZnONPs immobilization, to enable aptamer linkage and maintenance of the binding action.

Our results indicate that the aptamer assay can be applied as an analytical method for OTA detection in roasted coffee samples.

4. Conclusions

In this study, we have presented a simple and low cost aptasensor platform based on cysteine self-assembled layer, carboxyl-functionalized CNTs and ZnONPs for OTA detection in ground and roasted coffee samples. CV and EIS were applied to evaluate the OTA detection in the presence of the $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ redox probe. CV and EIS techniques revealed be useful for monitoring each stage of sensor development. The aptamer maintained its biological activity after immobilization on the electrode surface. We demonstrated that the sensor platform could be used to detect OTA in the ground and roasted coffee samples with high selectivity and sensitivity with a detection limit of 1.0 pg.mL^{-1} . The obtained level of sensitivity facilitates the use as a portable label-free sensor and for continuous quality monitoring of ground and roasted coffee samples.

Acknowledgments

The authors are grateful for support from the CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9) and FACEPE. Palmeira would like to thank CAPES for a PhD scholarship. The manuscript was written through contributions from all authors. All authors have approved the final version of the manuscript.

Table Captions

Table 1. Amperometric anodic displacement for aptasensor before and after hybridization with ochratoxin A.

Table 2. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Figure Captions

ANEXO AS IMAGENS DO PAPER

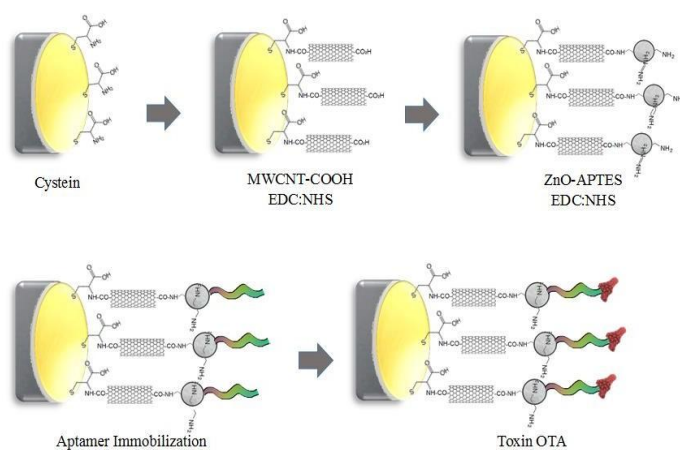


Fig. 1

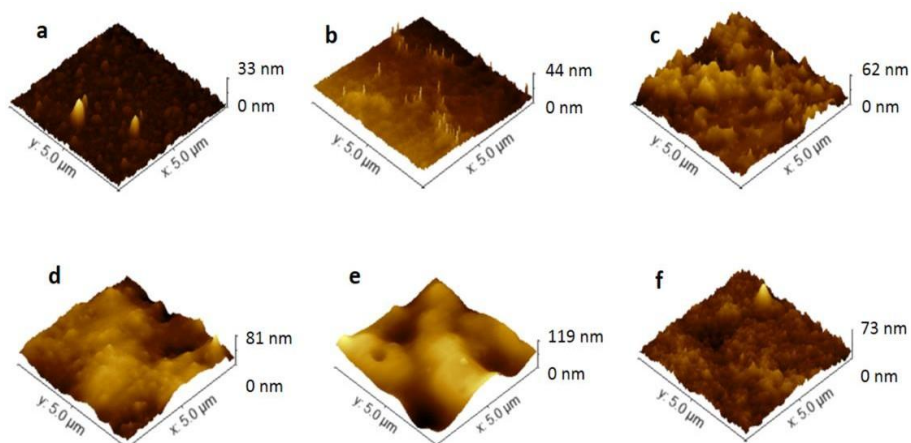


Fig. 2

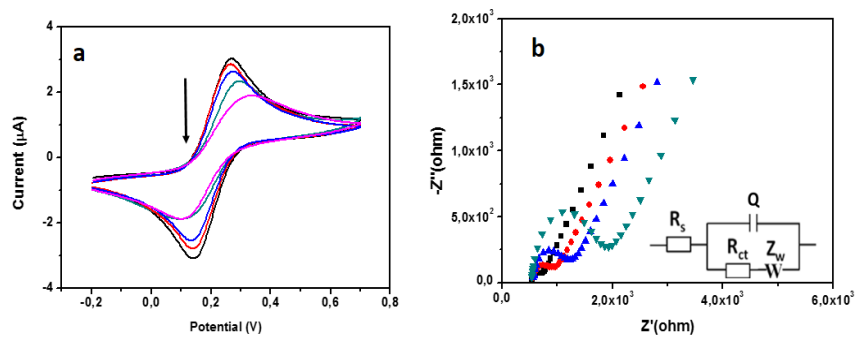


Fig. 3

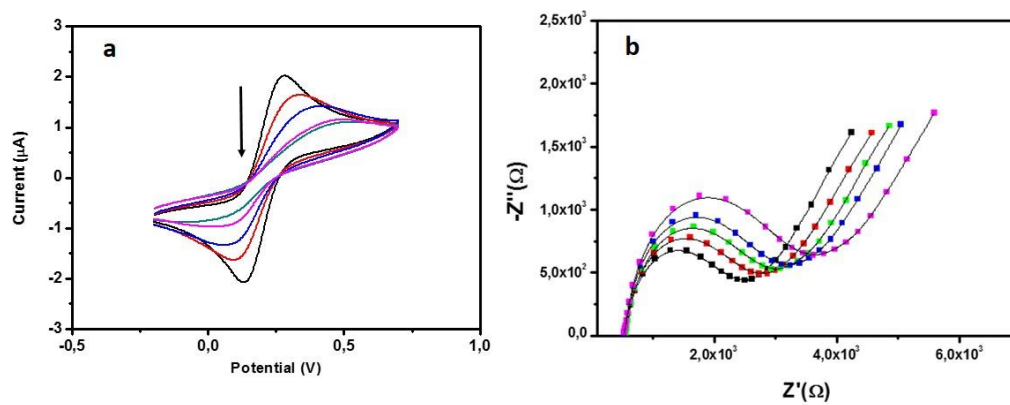


Fig. 4

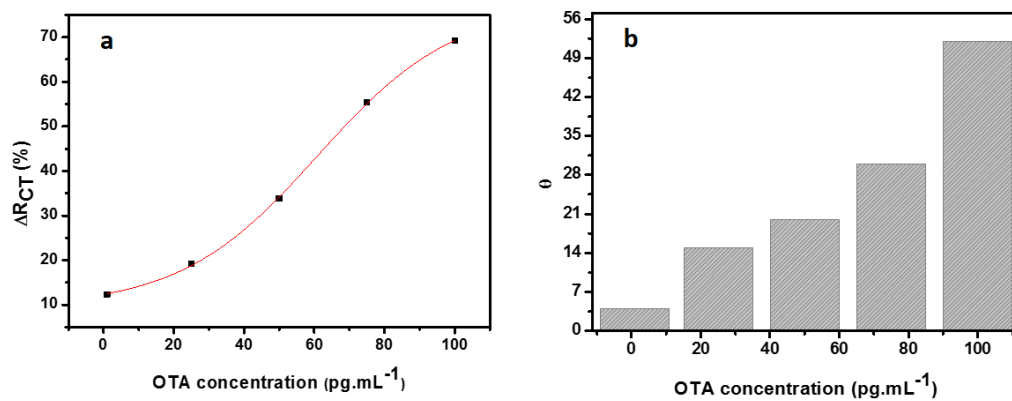


Fig. 5

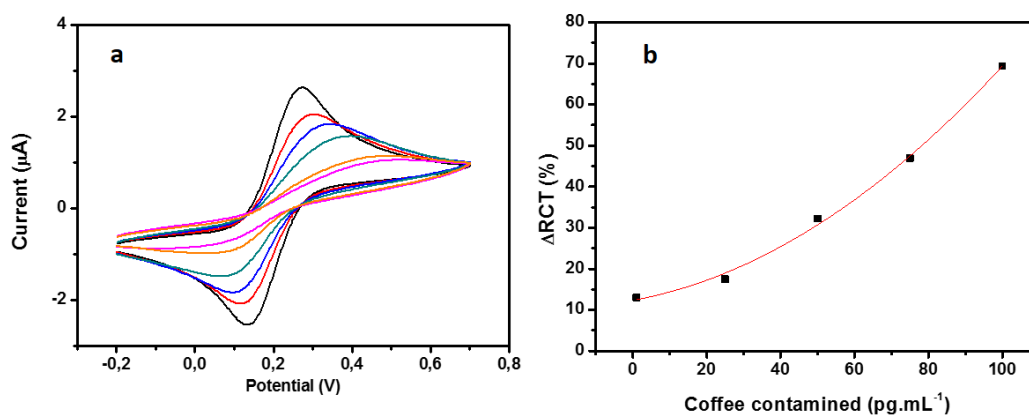


Fig. 6

REFERENCES

- [1] Nemeab, K., Mohammed, A. Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. *Food Control*, 78 (2017), 412-425.
- [2] Al-Anati, L., Petzinger, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29 (2006) 79–90.
- [3] K'oszegi, T., and Poór, M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins* 8 (2016), 1-25.
- [4] Pereira, V.L., Fernandes, J.O., Cunha, S.C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*. 36 (2014) 96-136.
- [5] Benites, A.J., Fernandes, M., Boleto, A. R., Azevedo, S., Silva, S., Leitão, A. L. Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*, 73 (2017) 1223-1228.
- [6] Lee, H. J., Ryu, D. Significance of Ochratoxin A in Breakfast Cereals from the United States. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63 (2015) 9404–9409.
- [7] Cappozzo, J., Jackson, L., Lee, H. J., Zhou, W., Al-taher, F., Zweigenbaum, J., RYU, D. Occurrence of Ochratoxin A in Infant Foods in the United States. *Journal of Food Protection*, 80 (2017) 251–256.
- [8] Villamizar-gallardo, R., Cruz, J.F.O., Ortiz-Rodriguez,O.O. Efeito fungicida de nanopartículas de prata em fungos toxigênicos em cacauero. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 12, p. 1929-1936, 2017.
- [9] Dzuman, Zbynek, et al. "Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids." *Analytica chimica acta*863 (2015): 29-40.
- [10] Jørgensen K. Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food--a review of EU occurrence data. *Food Additives & Contaminants*, 22 (2005) 26-30.
- [11] García-Moraleja, G., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E. Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. *Food and Chemical Toxicology*, 86 (2015) 225-233.
- [12] Long, F., Zhu, A. N., Sheng, J. W., He, M., & Shi, H. C. Matrix effects on the microcystin-LR fluorescent immunoassay based on optical biosensor. *Sensors*, 9 (2009) 3000–3010.
- [13] Flajs, D., Domijan, A.M., Ivic, D., Cvjetkovic, B., Peraica, M. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control*, 20 (2009) 590–592.

- [14] O'Sullivan, C.K. Aptasensors – the future of biosensing? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372 (2002) 44–48.
- [15] Hamula, C. L., Peng, H., Wang, Z., Tyrrell, G. J., Li, X. F., Le, X. C. An improved SELEX technique for selection of DNA aptamers binding to M-type 11 of *Streptococcus pyogenes*. *Methods*, 97 (2016) 51-57.
- [16] Lv, Z., Chen, A., Liu, J., Guan, Z., Zhou, Y., Xu, S., & Li, C. (2014). A simple and sensitive approach for ochratoxin A detection using a label-free fluorescent aptasensor. *PLoS One*, 9 (2014), 85968-85972.
- [17] Meirinho, S. G., Dias, L. G., Peres, A. M., Rodrigues, L. R. Development of an Electrochemical Aptasensor for the Detection of Human Osteopontin. *Procedia Engineering*, 87, 2014, 316-319.
- [18] Ghanbari, K., Roushani, M. A novel electrochemical aptasensor for highly sensitive and quantitative detection of the streptomycin antibiotic. *Bioelectrochemistry*, 120 (2018) 43-48.
- [19] Asuri, P., Bale, S. S., Pangule, R. C., Shad, D. A., Kane, R. C., Dordick, J. S. Structure, function, and stability of enzymes covalently attached to single-walled carbon nanotubes. *Langmuir* 23 (2007) 12318-12321.
- [20] Patel, P., Kansara, K., Senapati, V. A., Shanker, R., Dhawan, A., Kumar, A. Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Mutagenesis*, 31 (2016) 481-490.
- [21] Seongpil A., Bhavana N. J., Min W. L., Young, K., Sam S. Y. Electrospun graphene-ZnO nanofiber mats for photocatalysis applications. *Applied Surface Science*, 294 (2014) 24-28.
- [22] Nai-Feng, H., Ming, C., Kuei-Ting, H. Rapid synthesis of ZnO dandelion-like nanostructures and their applications in humidity sensing and photocatalysis. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 21 (2014) 200-205.
- [23] Juan, X., Hu, W., Ming, D., Liehui, Z. Synthesis and photocatalysis properties of ZnO structures with different morphologies via hydrothermal method. *Applied Surface Science*, 257 (2011) 6358-6363.
- [24] Low, S. S., Loh, H. S., Boey, J. S., Khiew, P. S., Chiu, W. S., Tan, M. T. Sensitivity enhancement of graphene/zinc oxide nanocomposite-based electrochemical impedance genosensor for single-stranded RNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 94 (2017) 365-373.

- [25] Salih, E., Mekawy, M., Hassan, R. Y., El-Sherbiny, I. M. Synthesis, characterization and electrochemical-sensor applications of zinc oxide/graphene oxide nanocomposite. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 6 (2016), 137-144.
- [26] M. Puiu, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, Progress in biosensor for mycotoxins assay, *Chem. Sensor* 4 (2014) 1–10.
- [27] B. Prieto-Simon, M. Campas, J.L. Marty, T. Noguer, Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 995–1002.
- [28] M. Heurich, M.K.A. Kadir, I.E. Tothill, An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis, *Sensor Act. B* 156 (2011) 162–168.
- [29] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerra, P. Duato, J.R. Castillo, An electrochemical immunosensor for ochratoxin A determination in wines based on a monoclonal antibody and paramagnetic microbeads, *Anal. Bioanal. Chem* 403 (2012) 1585–1593.
- [30] J. Yang, P. Gao, Y. Liu, R. Li, H. Ma, B. Du, Q. Wei, Label-free photoelectrochemical immunosensor for sensitive detection of Ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 13–18.
- [31] L. Bonel, J.C. Vidal, P. Duato, J.R. Castillo, Ochratoxin A nanostructured electrochemical immunosensors based on polyclonal antibodies and gold nanoparticles coupled to the antigen, *Anal. Method* 2 (2010) 335–341.
- [32] M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, L. Ferreira-Goncalves, M.J. Arcos-Martinez, Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1333–1337.
- [33] Pereira, A. C.; Santos, A. D. S. and Kubota, L. T.; Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, 25 : (2002, 1012-1021.
- [34] Grasset, F., Saito, N., Li, D., Park, D., Sakaguchi, I., Ohashi, N., Duguet, E. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Alloys and Compounds*, 360 (2003) 298-311.
- [35] Geremew, T., Abate, D., Landschoot, S., Haesaert, G., Audenaert, K. Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. *Food Control*, 69 (2016) 65-73.
- [36] Haskard, C. A., Binnion, C., Ahokas, J. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, 128 (2000) 39-49.

- [37] Simão E. P., Barbieri G. J. L. S., Andrade C. A. S, Oliveira M. D. L. Biosensor Based on Cysteine Monolayer and Monoclonal Antibody for Specific Detection of Aflatoxin B1 in Rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27 (2016) 1040-1047.
- [38] Huayhuas-Chipana B.C, Gomero J.C.M, Sotomayor M.D.P.T. Nanostructured screen-printed electrodes modified with self-assembled monolayers for determination of metronidazole in different matrices. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25 (2014) 1737-1745.
- [39] Castillo, G., Lamberti, I., Mosiello, L., Hianik, T. Impedimetric DNA Aptasensor for Sensitive Detection of Ochratoxin A in Food. *Electroanalysis*, 24 (2012) 512-520.
- [40] Mishra, R.K., Hayat, A., Catanante, G., Istamboulie, G., Marty, J.L. Sensitive quantitation of ochratoxin A in cocoa beans using differential pulse voltammetry based aptasensor, *Food Chemistry*, 192 (2016) 799–804.
- [41] Rhouati, A., Hayat, A., Hernandez, D.B., Meraihi, Z., Munoz, R., Marty, J.L. Development of an automated flow-based electrochemical aptasensor for on-line detection of ochratoxin A, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176 (2013) 1160–1166.
- [42] Mishra, R.K., Hayat, A., Catanante, G., Ocana, C., Marty, J.L. A label free aptasensor for ochratoxin A detection in cocoa beans: an application to chocolate industries, *Analytical Chimica Acta*, 889 (2015) 106–112.

5 CONCLUSÕES

Neste estudo, desenvolvemos duas plataforma sensoras, simples, de baixo custo e rápida, para detecção sensível e específica das micotoxinas AFB1 e OTA. Foi possível detectar AFB1 e OTA em farinha de milho e café, respectivamente. Com o emprego de nanotubos de carbono modificados com grupo COOH permitiu a manutenção da taxa de transferência de elétrons o que favoreceu à condutividade do sistema.

Em adição, os NTCs propiciaram um aumento da área de superfície para o adequado ancoramento do anticorpo anti-aflatoxina A e manutenção de sua conformação estrutural e bioativade. As técnicas eletroquímicas empregadas: espectroscopia de impedância eletroquímica e a voltametria cíclica foram úteis na avaliação do processo de bioreconhecimento e formação do complexo anticorpo-antígeno.

A variação relativa da impedância ($\Delta RCT\%$) demonstrou comportamento linear com aumento da concentração da AFB1 e em amostras de farinha de trigo. Já o emprego do aptâmero para OTA ocorreu por meio da imobilização covalentemente às nanopartículas de óxido de zinco. O Sistema Cys-ZnONPs-Apt demonstrou capacidade de detecção de OTA em amostras de pó comercial de café.

A utilização da microscopia de força atômica foi capaz de demonstrar a topografia das diferentes etapas de construção dos biossensores sendo evidenciado um aumento da rugosidade quando observada a presença do complexo aptâmero-OTA.

As avaliações das correntes de pico anódicas de catódicas foram eficientes para caracterização dos sistemas sensores para AFLA e OTA. Os sistemas desenvolvidos demonstraram que o uso de nanoestruturas são eficientes para a imobilização de anticorpos e aptâmeros.

Visto as plataformas apresentadas atingiram uma excelente sensibilidade atingindo limites de detecção na escala de picogramas, o que ressalta a utilidade desses sensores na detecção das toxinas citadas, como também no melhoramento dos alimentos desde do armazenamento até seu consumo. Desta forma, o imunossensor e o aptasensor desenvolvidos são ferramentas úteis para análise de toxinas em alimentos.

REFERÊNCIAS

- ALAM, A. U.; QIN, Y.; HAWLADER, M. M. R.; HU, N.-X.; DEEN, M. J. **Electrochemical sensing of acetaminophen using multi-walled carbon nanotube and β -cyclodextrin**. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 254, p. 896-909, 2018.
- ANESS.A.A., AJEET, K., PRATIMA, R.S., MALHOTRA, B.D. **Nanostructured zinc oxide plataform for mycotoxin detection**. Bioeletrochemistry. Journal elsevier, 2009.
- AUDE-GARCÍA, C., DALZON, B., RAVANAT, J. L., COLLIN-FAURE, V., DIEMER, H., STRUB, J. M. & RABILLOUD, T. (2016). **A combined proteomic and targeted analysis unravels new toxic mechanisms for zinc oxide nanoparticles in macrophages**. Journal of proteomics, 134, 174-185.
- AHUJA, A.,T., MIRA, I.A., KUMARA, D. RAJESH; **Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications**; Biomaterials 28, p.791-805, 2007.
- ABBAS, H.; CARTWRIGHT, R.D.; XIE, W.; SHIER, W.T. **Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas**. Crop Protection, London, v.25, p.1-9, 2006.
- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; SASTELLA, G.; CABANES, F. J. **Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger***. Applied Environmental Microbiology, v. 60, p. 2650-2052, 1994.
- AL-ANATI, L., PETZINGER, E. (2006). **Immunotoxic activity of ochratoxin A**. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 29, 79–90.
- ALBUQUERQUE, W. F., CALVET, R. M., ROCHA, C. A. R., MARTINS, P. C. C., NÓBREGA, M. M. G. P., COSTA, A. P. R., & MURATORI, M. C. S. (2016). **Efeitos da ocratoxina no desempenho do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*, *Bonne*)**. Arq. bras. med. vet. zootec, 68(5), 1334-1342.
- ALI, I.; RAHIS-UDDIN; SALIM, K.; RATHER, M. A.; WANI, W. A.; HAQUE, A. **Advances in nano drugs for cancer chemotherapy**. Current Cancer Drug Targets 2011, 11, 135.

ALMEIDA, A.P.; ALABURDA, J.; SHUNDO, L.; RUVIERI, V.; NAVAS, S. A. LAMARDO, L.C.A.; SABINO, M. **Ochratoxin a in Brazilian instant coffee**. Braz. J. Microbiol. v.38, p.300-303, 2007.

ANDRADE, V.M. **Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol**. Porto Alegre, 2006. Dissertação (Mestre em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AMORIM LCA. **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais**. Revista Brasileira de Epidemiologia, 2003; 6(2):158-170.
Oga S. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo (SP) Atheneu; 2003. P.501- 517.

ANVISA – **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 274 de 15 do outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RDC Nº 7, de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 fev.2011. Seção 1, p. 72-73, 2011.

BANERJEE J., NILSEN- HAMILTON M. **Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research**. J Mol Med, v. 91, p.1333–1342, 2013.

BALCONI, A., CAVALIEREa, C., CUCCI, F., FOGLIA, P., SAMPERI, R., LAGANA, A., 2008. **Journal of Chromatography A** 1179, 182–189.

BADEA, M.; FLOROIAN, L.; RESTANI, P.; MOGA, M. **Simple Surface Functionalization Strategy for Immunosensing Detection of Aflatoxin B1**. International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE 11 (2016) 6719 – 6734, doi: 10.20964/2016.08.21.

BAYMAN, P.; BAKER, J. L.; DOSTER, M. A.; MICHAILIDES, T. J.; MAHONEY, N. E. **Ochratoxin production by the Aspergillus ochraceus group and Aspergillus alliaceus**. Applied Environmental Microbiology, v. 68, p. 2.326-2.329, 2002.

BENNET, J.W. & KLICH, M. **Mycotoxins**. Clinical of Microbiology Review 16: 497–516. 2003.

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

BERGGREN, C.; BJAMASON, B. & JOHANSSON, G. **Capacitive Biosensors**. Electroanalysis 13, 173–180 (2001).

B.Q.WEI, R.VAJTAI, P.M.AJAYANJ, **Appl.Phys.Lett.**79 (2001) 1172-1174.

BUSTAMANTE, C.; KELLER, D.; **Phys. Today** 1995, 48, 32.

BINGGELI, M.; MATE, C.M.; **Influence of water vapor on nanotribology studied by friction force microscopy**. J.Vac.Sci.Technol.B, v.13, n.3, p.1312-1315, (1995).

BHUSHAN, B.; ed. **Handbook of Micro/ Nanotribology**. CRC Publishers, Boca Raton, FL, (1995).

BINNIG, G.; QUATE, C.F.; GERBER, Ch. **Atomic force microscope**. Phys. Rev. Let., v.56, n.9, p.930- 933, (1986).

BINNING, G.; FUCHS, H.; GERBER, Ch.; ROHRER, H.; STOLI, E.; TOSATTI, E.; **Europhys. Lett.** v.1, p.31, (1986).

BINNIG, G.; ROHRER, H.; **Sci. Am.** 1985, 253, 40.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K. **Formation and control of mycotoxins in food**. Journal of Food Protection, Des Moines, v.47, n.8, 637-646, 1984.

BLOUT, W. P. TURKEY “X” disease. Turkeys, v. 9, p. 52-58, 1961.

BRAIN CHEMISTRY. Disponível em:<http://chemicalparadigms.curiouscurie.com/cat=20>, acesso realizado em 20 de novembro de 2017 às 20h.

BRASIL. **Resolução RDC no 274**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União, 16/10/2002.

BRASIL. **Resolução no 34/76**, Ministério da Saúde, Diário Oficial da União, 19/01/1977.

BRITTO, P. J.; SANTHANAM, S. V.; AJAYAN, P. M. **Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine**. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, v. 41, p. 121-125, 1996.

BRUNO, J. G.; CARRILLO, M. P.; RICHARTE, A. M.; PHILLIPS, T.; ANDREWS, C. & LEE, J. S. “**Development, screening, and analysis of DNA aptamer libraries potentially useful for diagnosis and passive immunity of arboviruses**”. BMC Res Notes. v.5(633), p.1-12, 2012.

CASTILLO, A.; POTURNAYOVÁ, A.; SNEJDÁRKOVÁ, M.; HIANIK, T.; SPINELLA, K.; MOSIELLO, M. **Development of electrochemical aptasensor using dendrimers as immobilization plataforma for detection of Aflatoxin B1 in food samples**. ISBN: 978-1-4799-8591-3, INSPEC Accession Number: 15022015. DOI: 10.1109/AISEM.2015.7066764. 2015 XVIII AISEM Annual Conference.

CAPPOZO, J., JACKSON, L., LEE, H. J., ZHOU, W., AL-TAHER, F., ZWEINGENBAUM, J., RYU, D., **Occurrence of Ochratoxin A in Infant Foods in the United States**. Journal of Food Protection, Vol. 80, No. 2, 2017, Pages 251–256.

CHAMBERS, J. P. et al. **Biosensor Recognition Elements**. Curr. Issues Mol. Biol., v.10, p.1-12, 2008.

CIEGLER, A.; CENNEL, D. J.; MINTZLAFF, H. J.; LEISTHNER, L. **Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species**. Naturwissenschaften, v. 59, p. 365-366, 1972.

CHEN, H. L.; HSIAO, W. H.; LEE, H. C.; WU, S. C. & CHENG, J. W. **“Selection and characterization of DNA aptamers targeting all four serotypes of dengue viruses”**. PLoS One, v. 10(6): p. 1-13, 2015.

CHIU, TAI-CHIA; HUANG, CHIH-CHING. **Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors**. Sensors, v.9, p.10356-10388, dez 2009.

CHICHESTER, B. L.; **Procedures in Scanning Probe Microscopies**, John Wiley & Sons, Inc.: England, 1998.

CHOY, W.N. **A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B1 and its implications to quantitative cancer-risk assessment**. Mutation Research, Amsterdam, v.296, p.181- 198, 1993.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P.; Salunkhe, D.K. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.103-143.

CNOSSEN, E. DE J. N. **Seleção e Caracterização de Aptâmeros de RNA Ligantes à Região 5' UTR do Genoma do Vírus da Dengue**. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG/RC, 2014. Dissertação de mestrado. 71p.

CREPPY, E. E. **Human ochratoxicosis**. Journal of Toxicology and Toxin Review, v. 18, p. 277-293, 1999.

COELHO, M. K. L.; GIAROLA, J. F.; SILVA, A. T. M.; TARLEY, C. R. T.; BORGES, K. B.; PEREIRA, A. C. **Development and Application of Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer and Carbon Nanotubes for the Determination of Carvedilol**. Chemosensors, v. 4, p. 1-15, 2016.

COSTA, M P.; FRÍAS, I.A. M.; ANDRADE, C.A. S.; OLIVEIRA, M. D. L. **Impedimetric immunoassay for aflatoxin B1 using a cysteine modified gold electrode with covalently immobilized carbon nanotubes**. Microchimica acta, 2017.

CHU, F. S. **Studies on ochratoxins**. Critical Reviews in Toxicology, v. 2, p. 499-524, 1974.

C.JIANG, T.YANG K.; JIAO, H.; GAO **Eletrochem**,Acta 53(2008),2917

D.P. JONES, Y.-M. GO, C.L. ANDERSON, T.R. ZIEGLER, J.M. KINKADE, W.G. KIRLINI, **Cys-teine/cysteine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologicredox signaling and control**, The FASEB Journal 18 (2004) 1246–1248.

D'OZARIO,P.,**Biosensors in clinical chemistry**.Clin.Chim.Acta 2003,334,(1-2),41-69.

D'SOUZA, S.F.; **Biosens.** Bioelectron,2001,16,337.

DUCLAIR, S.; GAUTAM, A.; ELLINGTON, A. & PRASAD, V. R. **“High-affinity RNA aptamers against the HIV-1 protease inhibit both in vitro protease activity and late events of viral replication”**. Mol. Ther. Nuc. Ac., v.4, 2015. ELLINGTON, A. D. & SZOSTAK, J. W. “In vitro selection of RNA mole.

FATEMI, F.; ALLAMEH, A.; DADKHAH, A.; FOROUZANDEH, M.; KAZEMNEJAD, S.; SHARIFI, R. **Changes in hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity and expression of its class-P during prenatal and postnatal period in rats treated with aflatoxin B1**, Archives of Toxicology, Berlin, v. 80, n. 09, p. 572-579, 2006.

FLETCHER, S. J.; PHILLIPS, L. W.; MILLIGAN, A. S. & RODDA, S. J. **“Toward specific detection of Dengue virus serotypes using a novel modular biosensor”**. Biosens. Bioelectron.v.25(4): p.1696-1700, 2010.

FOGUEL, M.V. **Desenvolvimento de imunossensores para aflatoxina B1**. 2011. 93 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/97840>>.

FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L.; MANSILLA, M.L.; TADEO, J.L. **Mycotoxins in fruits and their processed products: analysis, occurrence and health implications**. Journal of Advanced Research, v. 1, p.113–122, 2010.

FORGACS, J. **Mycotoxinoses - the neglected diseases**. Feedstuffs, Mineapollis, v. 34, p. 124-134, 1962.

FREIRE, RS.; PESSOA CA.; KUBOTA, LT.; **Emprego de monocamadas autoorganizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos**.Química Nova. 2002; 26(3): 81-389.

FREIRE, R. S.; TANAKA, A. A.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. and Kubota, L. T.; **Amperometric sensors based on biomimetic catalysts**. Vol. 1 (ed. (Org.), C.A.G.E.C.D.M.V.P.) 195-210 (Encyclopedia of Sensors. Stevenson Ranch, California: American Scientific Publishers, 2006).

DIGITAL INSTRUMENTS, **NanoScope Command Reference Manual**, Santa Barbara – CA **Park Scientific Instruments**, A practical guide to scanning probe microscopy, p. 74 (1996).

- FAISANDIER, L. FOUILLET, A., BICOUT, D.J. GOLLIOT, F. AHMED, I. BRINGAY, S. EILSTEIN, D. **Surveillance and detection of unusual events in toxicovigilance: Review of relevant methods.** Rev Epidemiol Sante Publique. 63(2):119-131, 2015.
- FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H.; **Quim. Nova**, 2006, 29, 137.
- FERREIRA, A.A.P.; COLLI, W.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H.; **Biosens. Bioelectron.**, 2005. 21, 175.
- FAGAN, S. B., **Funcionalização de Nanotubos de Carbono: uma Abordagem de Primeiros Princípios**, Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Maria (2003).
- FEY, G. T.-K.; WENG, Z.-X.; CHENG, J.-G.; KUMAR, T. P.; **Mater. Chem. Phys.** 2003, 80, 309.
- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C.; **Quim. Nova**, 2002, 25, 455.
- FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M.D. **Biossensores.** Química Nova, v. 15, n. 1, p.28-39, 1992.
- FROMMER, J.; **Scanning probe microscopy of organics, an update.** Thin Solids Films. v.273, p.112-115, (1996).
- FOOLASDSAZ, K.; NEGAHDARY, M.; RAHIMI, G.; HABIBI-TAMJANI, A.; PARSANIA, S.; AKBARI-DASTJERDI, H.; SAYAD, A.; JAMALEDINI, A.; SALAHI, F.; ASADI, A. **Dopamine Determination with a Biosensor Based on Catalase and Modified Carbon Paste Electrode with Zinc Oxide Nanoparticles.** International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE. 7 (2012) 9892 – 9908.
- FORRESTER, L.M.; NEAL, G.E.; JUDAH, D.J.; GLANCEY, M.J.; WOLF, C.R. **Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver.** Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington, v.87, p.8306-8310, 1990.
- GARCÍA-MORALEJA, G., MAÑES, J., FERRER, E. **Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults.** Food and Chemical Toxicology Volume 86, December 2015, Pages 225-233.
- GANJI, M.D. **Density functional theory based treatment of amino acids adsorption on single-walled carbon nanotubes,** ScienceDirect, v.18, p.662–668, 2009.
- GAUA, V. et al. **Electrochemical Molecular Analysis without Nucleic Acid Amplification.** Methods, v.37, n.1, p.73-83, set 2005.
- GASPAROTTO, G.; COSTA, J.P.C.; COSTA, P.I. Costa.; ZAGHETE, M.A.; MAZON, T. **Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection.** Materials Science & Engineering C. 2017. S0928-4931(16)31405-9 DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.031. MSC 7365.

GEYIKOGLU, F.E.; TÜRKEZ, H. **Protective Effect of Sodium Selenite on Genotoxicity to Human Whole Blood Cultures Induced by Aflatoxin B1**. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v.48, n.6, p.905-910, 2005.

EVTUGYN, G.; CHERKINA, U.; PORFIREVA, A.; DANBERGER, J.; EBNER, A.; HIANIK, T. **Electrochemical Aptasensor Based on ZnO Modified Gold Electrode**. Electroanalysis 2013, 25, No. 8, 1855 – 1863.

GIL, E.S.; KUBOTA, L.T.; YAMAMOTO, Y.I.; **Quim.Nova**, 1999, 22,814.

GIL, E. de S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. **Some aspects of immunoassays applied to analytical chemistry**. Química Nova 1999, 22, 874. [CrossRef]

GOLDBLATT L.A. **Aflatoxin – Scientific Background**, Control and Implications. New York: Academic Press 1969. P.13-54.

GOYER N, LAVOIE J, LAZURE L, MARCHAND G. **Bioaerosols in the workplace: evaluation, control and prevention guide**. Québec: Institut de Recherche en Santé et en Sécurité Du Travail du Québec; 2001.

GUTIERREZ, F. A.; RUBIANES, M. D.; RIVAS, G. A. **Electrochemical sensor for amino acids and glucose based on glassy carbon electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes and copper microparticles dispersed in polyethylenimine**. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 765, p. 16-21, 2016.

HERR, J. K.; SMITH, J. E.; MEDLEY, C. D.; SHANGGUAN, D. & TAN, W. **“Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells”**. Anal. Chem.v.78(9): p.2918-2924, 2006

HERMANN, T. & PATEL, D. J. **“Adaptive recognition by nucleic acid aptamers”**. Science, v. 287(5454): p.820-825, 2000.

HSIEH, D.P.H.; ATKINSON, D.N. **Bifuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity**. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 283, p. 525-532, 1991.

HOLLAS, J. M. **Modern Spectroscopy**. Wiley, 2004.

HOLLINGER, K.; EKPERIGIN, H.E. **Mycotoxins in food producing animals**. Chemical Food Borne Hazards and their Control, Philadelphia, v.15, n.1, p.133- 165, 1999.

HYUN JUNG LEE, H.J., DOJIN RYU, D. **Significance of Ochratoxin A in Breakfast Cereals from the United States**. School of Food Science, University of Idaho, 875 Perimeter Drive MS 2312, Moscow, Idaho 83844–2312, United States. J. Agric. Food Chem., 2015, 63 (43), pp 9404–9409

HUA, M. et al. **Label-free Electrochemical Cocaine Aptasensor Based on a Targetinducing Aptamer Switching Conformation.** Analytical Sciences, v.26, p.1265-1270, dez 2010.

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

ISLAM, M. F; ROJAS E; BERGEY D. M; JOHNSON, A. T; YODH A. G. **High Weight Fraction Surfactante Solubilization of Single-Wall Carbon Nanotubes in Water.** Nano Letters, v.3, p.269, 2003.

ISRAELACHIVILI, J.; **Intermol and Surf. Forces**, Academic Press, San Diego, CA, p.312, (1992).

JAYASENA D. SUMEDHA. **Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics.** Clinical Chemistry, v. 45, p. 1628-1650, 1999.

JUAN, X.; HU, W.; MING, D.; LIEHUI, Z. **Synthesis and photocatalysis properties of ZnO structures with different morphologies via hydrothermal method.** Applied Surface Science 2011, 257, 6358.

J.KOEHNE, J.LI, A.M.CASSEL, H.CHEM, Q.YE, H.T.NG.Q.YE, W.FAN.J.HAN, M.MEYYPAN, J.**Mat.Chem.**14 (2004) 676-684.

J.ZHANG, H.ZOU, Q.QING, Y.YANG, Q.LI, Z.LIU, X.GUO, Z.DU, J.**Phys.Chem.B** 107 (2003) 3712-3718.

J. MUÑOZ, J. BASTOS-ARRIETA, M. MUÑOZ, D. MURAVIE, F. CÉSPEDES, M. BAEZA, **Simple green routes for the customized preparation of sensitive carbon nanotubes/epoxy nanocomposite electrodes with functional metal nanoparticles**, RSC Adv. 4 (2014) 44517–44524.

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

JUAN, X.; HU, W.; MING, D.; LIEHUI, Z. **Synthesis and photocatalysis properties of ZnO structures with different morphologies via hydrothermal method.** Applied Surface Science 2011, 257, 6358.

KUTLUAY, A.; ASLANOGLU, M. **Nickel nanoparticles functionalized multi-walled carbon nanotubes at platinum electrodes for the detection of bromhexine.** Sensors and Actuators B, v. 192, p. 720–724, 2014.

KHALI, M. M.; EL-AZIZ, G. M. A. **Multiwall carbon nanotubes chemically modified carbon paste electrodes for determination of gentamicin sulfate in pharmaceutical preparations and biological fluids.** Materials Science and Engineering C, v. 59, p. 838–846, 2016.

KRISZTINA, M. B.; ZALÁN, Z.; MORTL, M.; JURACSEK, J.; SZENDRO, I.; SZEKÁCS, A.; ADÁNYI, N. **Optical waveguide lightmode spectroscopy technique-based immunosensor development for aflatoxin B1 determination in spice paprika samples.** Food Chemistry 211 (2016) 972–977.

KKAYOON, W. S., SAAD, B., YAN, C. B., HASHIM, N. H., ALI, A. S. M., SALLEH, M. I., SALLEH, B., 2010. **Food Chemistry** 118, 882–886.

KLAASSEN, C. D. (ED.). **Casarett and Doull's Toxicology; The Basic Science of Poisons.** 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 1236 p.

K. I. OZOEMENA, T. NYOKONG, P. WESTBROEK, **Self-assembled monolayers of cobalt and iron phthalocyanine complexes on gold electrodes: comparative surface electrochemistry and electrocatalytic interaction with thiols and thiocyanate,** Electroanalysis. 15 (2003) 1762–1770).

KUMERA N. ALI, M. **Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies.** A review. Food Control Volume 78, August 2017, Pages 412–425.

LARSEN, T. O.; SVENDSEN, A.; SMEDSGAARD, J. **Biochemical characterization of ochratoxin A – producing strains of the genus Penicillium.** Applied and Environmental Microbiology, v. 67, p. 3.630–3.635, 2001.

LEVY-NISSENBAUM, E.; RADOVIC-MORENO, A. F.; WANG, A. Z.; LANGER, R. & FAROKHZAD, O. C. **“Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery”.** Trends Biotechnol. v.26(8): p.442–449, 2008.

LEE, JEONG-O et al. **Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors.** Anal Bioanal Chem, v.390, p.1023–1032, 2008.

LEITE, F. R. F.; MARONEZE, C. M.; OLIVEIRA, A. B.; SANTOS, W. T. P.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. **Development of a sensor for L-Dopa based on Co(DMG)2ClPy/multi-walled carbon nanotubes composite immobilized on basal plane pyrolytic graphite electrode.** Bioelectrochemistry, v. 86, p. 22–29, 2012.

LEI, L. V. CHENGBI CUI, CHENGYUN LIANG, WURONG QUAN, SIHONG WANG, ZHIJUN GUO. **Aptamer-based single-walled carbon nanohorn sensor for ochratoxin A detection.** Food Control. Elsevier 2015.

- LEONI, L.A.B.; FURLANI, R.P.Z.; VALENTE SOARES, L.M.; OLIVEIRA, P.L.C. **Ochratoxin A in Brazilian green coffee**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.21, n.1, p.105-107, 2001.
- LI, P., ZHANG, Q., ZHANG, W., 2009. **TrAC Trends in Analytical Chemistry** 28, 1115–1126.
- LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y. **Functional Nucleic Acid Sensors**. *Chem Rev*, v.109, n.5, p.1948-1998, mai 2009.
- LOU, X. et al. **Micromagnetic Selection of Aptamers in Microfluidic Channels**. *PNAS*, v.106, n.9, p.2989-2994, fev 2009.
- LISDAT, F.; SCHAEFER, D. **The use of eletrochemical impedance spectroscopy for biosensing**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.391, n.5, p.1555-1567, 2008.
- LI, X.; JU, H.Q.; DING, C.F.; ZHANG, S.S.; **Anal. Chim. Acta** 2007, 582, 158.
- LIU, Z.; GAO, J.; YU, J. **Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China**. *Journal of Stored Products Research*, Oxford, v.42, p.468-479, 2006.
- LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.; **Anal.Chim.Acta**, 2006, 568, 200.
- LEHNINGER; N., D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, (2002).
- LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; Smith, T. K.; **J. Agric. Food Chem.** 2006, 54, 9623.
- LOW, S. S., LOH, H. S., BOEY, J. S., KHIEW, P. S., CHIU, W. S., & TAN, M. T. (2017). **Sensitivity enhancement of graphene/zinc oxide nanocomposite-based electrochemical impedance genosensor for single stranded RNA detection**. *Biosensors and Bioelectronics*, 94, 365-373.
- LU, D. et al. **The Role of Molecular Modeling in Bionanotechnology**. *Phys Biol*, v.3, n.1, p.S40-S53, 2006.
- LUPA, P.B.; SO.KOLL, L.J.; CHAN, D.W.; **Clin.Chim.Acta**, 2001, 1-26.
- MAO, A.; LI, H.; YU, L.; HU, X. **Electrochemical sensor based on multi-walled carbon nanotubes and chitosan-nickel complex for sensitive determination of metronidazole**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 799, p. 257-262, 2017.
- MARANGONI, K.; NEVES, A. F.; ROCHA, R. M.; FARIA, P. R.; ALVES, P. T.; SOUZA, A. G.; FUJIMURA, P. T.; SANTOS, F. A.; ARAÚJO, T. G.; WARD, L. S. & GOULART, L. R. **“Prostate-specific RNA aptamer: promising nucleic acid antibody-like cancer detection”**. *Sci. Rep.*, v.5:12090, 2015.
- MARINHO, M. I. C.; **Desenvolvimento de eletrodo modificado com polímero de azul de metileno para a determinação eletroanalítica de glifosato**. Dissertação de Mestrado, 2010, Instituto de Química, USP, São Carlos.

MAJIDI, M. R.; OMIDI, Y.; KARAMI, P.; JOHARI-AHAR, M. **Reusable potentiometric screen-printed sensor and label-free aptasensor with pseudo-reference electrode for determination of tryptophan in the presence of tyrosine.** *Talanta*, v. 150, p. 425-433, 2016.

MERCK. The Merck Index. 12 ed. **New Jersey:** Merck & Co, Inc, 1996.

M. NOSEK, P. WEROŃSKI, P., NOWAK, J. BARBASZ, **Corrigendum to Voltammetric studies of colloidal particle monolayer on a gold rotating disk electrode**[*Colloids Surf. A: Physico chem. Eng. Aspects* 403 (2012) 62-68], *Colloids and Surfaces A: Physico chem. Eng. Aspects*, 429 (2013) 159.

M. NOSEK, P. WEROŃSKI, P. NOWAK, J. BARBASZ, **Voltammetric studies of colloidal particle monolayer on a gold rotating disk electrode**, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 403 (2012) 62.

MATERON, E. M.; WONG, A.; KLEIN, S.; LIU, J.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. **Multiwalled carbon nanotubes modified screen-printed electrodes for cisplatin detection.** *Electrochimica Acta*, v. 158, p. 271–276, 2015.

MARCO, J. P.; BORGES, K. B.; TARLEY, C. R. T.; RIBEIRO, E. S.; PEREIRA, A. C. **Development of a simple, rapid and validated square wave voltametric method for determination of promethazine in raw material and pharmaceutical formulation using DNA modified multiwall carbon nanotube paste electrode.** *Sensors and Actuators B*, v. 177, p. 251–259, 2013.

MAEHASHI, K.; MATSUMOTO, K. **Label-Free Electrical Detection Using Carbon Nanotube-Based Biosensors.** *Sensors*, v.9, p.5368-5378, jul 2009.

MAIRHOFER, J.; ROPPERT, K.; ERTL, P. **Microfluidic Systems for Pathogen Sensing: A Review.** *Sensors*, v.9, p. 4804-4823, jun 2009.

MENCIN, N.; ŠMUC, T.; VRANIČAR, M.; MAVRI, J.; HREN, M.; GALEŠA, K.; KRKOČ, P.; ULRICH, H. & ŠOLAR, B. **“Optimization of SELEX: Comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers”.** *J. Pharm. Biom. Anal.*, v.91: p.151-159, 2014.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. **Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors.** *Analytical Sciences*, v.20, p.1113-1126, agosto 2004.

MEDEIROS VPB, SILVA GS, LIMA EO, PEREIRA FO. **Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos.** *Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo*, 74 (3):266-73, 2015.

MISTRY, K. K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. **A Review on Amperometric Type Immunosensors Based on Screen-Printed Electrodes.** *Analyst*, 2014, 139, 2289-2311.

- MISSAILIDIS & HARDY. **Aptamers as inhibitors of target proteins. Expert Opin. Ther. Patents**, v. 19, n° 8, p. 1-10, 2009
- MISHRA,R.,HAYAT,A.,CATANANTE,G.,ISTAMBOULIE,G.,MARTY,J.,2016.**Food Chem.**192, 799–804.
- MOZAZ, S.R.; MARCO, M.P.; ALDA,M.J.I.; BARCELÓ,D.; **Pure Appl. Chem.**, 2004,723.
- MORGAN, C. L.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P.; **Clin. Chem.** 1996, 42, 193.
- M.NAIM, U.ZEHAVI, I.ZUKER, R.L.ROUSSEF, S.NAGY,**Sulfur Compounds in Foods**,1994,cap 7, pp. 80-89.
- MEYER, E.; **Atomic force microscopy**. Prog in Surf. Sci. v.41, p.3-49, (1992).
- MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. **Food Mycotoxins: An Update**. J. Food Scien. v.71, n.5, p.51-65, 2006.
- NAI-FENG, H.; MING, C.; KUEI-TING, H. **Rapid synthesis of ZnO dandelion-like nanostructures and their applications in humidity sensing and photocatalysis**. Materials Science in Semiconductor Processing 2014, 21, 200.
- NAUMANN, D. **Infrared spectroscopy in Microbiology**. Encyclopedia of Analytical Chemistry, ed. R. A Meyers, Chichester, p. 102-131, 2000.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger Artmed**, 2014.
- NONAKA, Y., SAITO, K., HANIOKA, N., NARIMATSU, S., KATAOKA, H., 2009. **Journal of Chromatography A** 1216, 4416–4422.
- O’SULLIVAN, C.K. **Aptasensors – the future of biosensing. Analytical and Bioanalytical Chemistry** January 2002, Volume 372, Issue 1, pp 44–48.
- OHNESORGE, F.; BINNIG, G.; **Science** 1993, 260, 1451.
- OVEMEY, R.; MEYER, E.; **Tribological investigations using friction force microscopy**. MRS Bull., p.26-34, (1993).
- OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheney, 1996. 515p.
- OLIVEIRA, M. D. L.; A.S.; CORREIA, MARIA T.S.; B.; PANKAJ, R.S.; ZENG, X. **Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 362, p. 194-201, 2011.
- P. WERO’NSKI, M. NOSEK, P. BATYS, **Limiting diffusion current at rotating diskelectrode with dense particle layer**, J. Chem. Phys 139 (2013) 124705.

PATEL, P., KANSARA, K., SENAPATI, V. A., SHANKER, R., DHAWAN, A., & Kumar, A. (2016). **Cell cycle dependent cellular uptake of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells**. *Mutagenesis*, 31(4), 481-490.

PANKE, O., BALKEHNHOHL, T., KAFKA, J., SCHAFER, D. & LISDAT, F. **Impedance Spectroscopy and Biosensing**. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 109, 195–237 (2008).

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. **Cancer Research – Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research**. *Azojono Journal of NanotechnologyOnline*, v.3, set 2007.

PELUQUE, ERIKA. **Isolamento, identificação molecular e potencial toxigênico de fungos e ocorrência de micotoxinas em misturas de cereais comercializadas no Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.

PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. **Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. *B. Ceppa*. v.20, n.1, p.141-156, 2002.)

PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. **Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. *B. Ceppa*. V.20, n.1, p.141-156, 2002.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S. and KUBOTA, L. T.; **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas**. *Química Nova*, 25:(2002, 1012-1021.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. **Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano**. *Bol. OMS*. n.2, 2000.

PARK SCIENTIFIC INSTRUMENTS, **A practical guide to scanning probe microscopy**, p. 74 (1996).

PITT, J. I. **Penicillium viridicatum, Penicilium verrucosum, and production of ochratoxin A**. *Applied Environmental Microbiology*, v. 53, p. 266-269, 1987.

PURCHASE, I. F.; VAN DER WATT, J. J. **Carcinogenicity of sterigmatocystin**. *Food and Cosmetics Toxicology*, v. 8, n.3, p. 289-295, 1970.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S.; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G.; VELOSO, T.; BARROSO, E. S. **Incidência de ochratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 2, p. 192-196, 2000.

QUITINO, M. S. M.; **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a Batch Injection Analysis (BIA) para aplicações analíticas.** Tese de Doutorado, 2003, Instituto de Química, USP, São Paulo.

RADOM, F.; JUREK, P. M.; MAZUREK, M. P.; OTLEWSKI, J. & JELENÍ, F. **“Aptamers: molecules of great potential”.** Biotechnol. Adv., v.31(8): p.1260- 1274, 2013.

RAVERA, M. et al. **DNA-Metallodrugs Interactions Signaled by Electrochemical Biosensors: An Overview.** Bioinorganic Chemistry and Applications, v.2007, 2007.

RASOOLY, A. **“Biosensor technologies”**, Methods 37: 1-3, 2005.

RAISUDDIN, S. **Toxic responses to aflatoxins in a developing host.** Journal of Toxicology: Toxin Review, v. 12, p. 175-201, 1993.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. **Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage.** Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v.387, n.1, p.87-93, 2006.

R.R.MOORE,C.E.BANKS,R.G.Compton ,Anal.Chem. 76 (2004) 2677-2682.

RICCARDI, S.S.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H.; **Quim.Nova**,2002,25, 316.4.

RIBEIRO, F. A. S.; TARLEY, C. R. T.; BORGES, K. B.; PEREIRA, A. C. **Development of a square wave voltammetric method for dopamine determination using a biosensor based on multiwall carbon nanotubes paste and crude extract of Cucurbita pepo L.** Sensors and Actuators B, v. 185, p. 743–754, 2013.

ROHMAN, A.; MAN, Y. B. C.; **Food Res. Int.** 2010, 43, 886.

ROSSETO CAV, VIEGAS EC, LIMA TM. **Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e das épocas de amostragem.** Bragantia, Campinas. 2003; 62(3): 437-45.

ROSSATO, S. S., FREIRE, R.S., DURÁN, N.E KUBOTA, L.T.; **Biossensores amperometricos para detecção de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental.** Química Nova, Vol.24, No. 1,p.77-86,2001.

SALAMANCA-NETO, C. A. R.; TARLEY, C. R. T.; HATMURA, P. H.; SARTORI, E. R. **Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes paste electrode.** Ionics, v. 21, p. 1615e1622, 2014.

SALIH, E., MEKAWY, M., HASSAN, R. Y., & EL-SHERBINY, I. M. (2016). **Synthesis, characterization and electrochemical-sensor applications of zinc oxide/graphene oxide nanocomposite.** Journal of Nanostructure in Chemistry, 6(2), 137-144.

SANTOS, C.C.M.; LOPES, M.R.V.; KOSSEKI, S.Y. **Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José de Rio Preto/SP.** Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v.60, n.2, p.153-157, 2001.

SANTURIO JM. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 2000. 2(1).

SHARMA, S.K.; SEGHAL.; KUMAR,A.;**Curr.App.Phys.**,2003,3,307.

SALKIND, A. J.; SINGHI, P.; CANNONE, A.; ATWATER, T.; WANG, X.; **Reisner, D.**; J. Power Sources 2003, 116, 174.

SAITO, R. et al., **Electronic structure of chiral graphene tubules.** Applied Physics Letters, v. 60, p. 2204-2206, 1992.

SEONGPILA. BHAVANA. N. J.; MIN. W. L.; YOUNG, K.; SAM S. Y. **Electrospun graphene-ZnO nanofiber mats for photocatalysis applications.** Applied Surface Science 2014, 294, 24.

SIMÃO, ESTÉFANI P.; CAO-MILÁN, ROBERTO; COSTA-PEDRO, GRACIELA; DE'MELO, CELSO P.; CAO, ROBERTO; OLIVEIRA, MARIA D. L.; ANDRADE, CESAR A. S. **Simple and Fast Picomolar Detection of Ochratoxin A Using a Reusable Label Free Aptasensor Built with a Layer-by-layer Procedure.** ELECTROANALYSIS, v. 29, p. 1-9, 2017.

SIMÃO, E.P., BARBIERI, G.J.L.S., ANDRADE, C.A.S., OLIVEIRA, M.D.L. **Biosensor Based on Cysteine Monolayer and Monoclonal Antibody for Specific Detection of Aflatoxin B₁ in Rice.** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-1, 2016. Printed in Brazil ©2016 Sociedade Brasileira de Química.

SILVA, A. G. **Isolamento de Aptâmeros Ligantes à Sequência 3' -UTR do RNA do Vírus da Dengue.** Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG/RC, 2015. Dissertação de mestrado. 65 p.

STOLTENBURG R., REINEMANN C., STREHLITZ B. **SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands.** Biomolecular Engineering, v. 24, p. 381–403, 2007.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. **Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions.** International Journal of Nanomedicine, v.1, n.4, p.433-440, 2006.

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

SOARES LMV e FURLANI RPZ. **Survey of mycotoxins in wheat and wheat products sold in health food store of the city of Campinas, state of São Paulo**. Rev. Microbiol. 1996; 27(1): 41-4.

SETFORD, S.J.; **Trends Anal. Chem.**, 2000. 19, 330.

SCANNING PROBE MICROSCOPY TRAINING NOTEBOOK, **Digital Instruments**, 1998.

SONG, K-M.; LEE, S. & BAN, C. **“Aptamers and their biological applications”**. Sensors, v.12(1): p.612-631, 2012.

SUN, H.; ZHU, X.; LU, P. Y.; ROSATO, R. R.; TAN, W. & ZU, Y. **“Oligonucleotide Aptamers: new tools for targeted cancer therapy”**. Mol. Ther. Nuc. Ac., v.3, 2014.

SHARMA, A.; GOUD, K.Y.; HAYAT, A.; BHAND, S.; MARTY, J.L. **Recent Advances in Electrochemical-Based Sensing Platforms for Aflatoxins Detection**. Chemosensors 2017, 5(1), 1; doi:10.3390/chemosensors5010001.Review.

SYED, M. A. & PERVAIZ, S. **“Advances in aptamers”**. Oligonucleotides, v.20: p.215–224, 2010.

SWENSEN J. S., XIAO Y., FERGUSON B. S., LUBIN A. A., LAI R. Y., HEEGER A. J., et al. **Continuous, real-time monitoring of cocaine in undiluted blood serum via a microfluidic, electrochemical aptamer-based sensor**. J Am Chem Soc, v. 131, n°12, p. 4262–6, 2009.

TARÍN, A.; ROSSEL, M.G.; GUARDINO, X. **Use of high-performance liquid chromatography to assess airborne mycotoxins aflatoxins and ochratoxin A**. Journal of Chromatography A, New York, v.1047, p.235-240, 2004.

THÉVENOT, D. R. et al. **Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification**. Biosensors & Bioelectronics, v.16, p.121-131, 2001.

TOBIA J. KOPLIN., MAIKE SIEMONS., CÉSAR OCÉN-VALÉNTIN., DANIEL SANDERS and ULRICH SIMON. **Workflow for High Throughput Screening of Gas Sensing Materials**. Sensors 2006, 6(40), 298-307.

TONG, W.M.; LEE, M.K.; GALENDO, D.; WANG, Z.Q.; SABAPATHY, K. **Aflatoxin-B exposure does not lead to p53 mutations but results in enhanced liver cancer of Hupki (human p53 knock-in) mice**. International Journal of Cancer, Geneva, v.119, p.745-749, 2006.

TUERK, C. & GOLD, L. **“Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase”**. Science, v.249: p.505–510, 1990.

VILLAMIZAR-GALLARDO, R., Cruz, J.F.O., ORTIZ-RODRIGUEZ, O.O. **Efeito fungicida de nanopartículas de prata em fungos toxigênicos em cacaueiro**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 51, n. 12, p. 1929-1936, 2017.

- VABBINA, P.K.; KAUSHIK, A.; POKHREL, N.; BHANSALI, S.; PALA, N.
Electrochemical cortisol immunosensors based on sonochemically synthesized zinc oxide 1D nanorods and 2D nanoflakes. *Biosensors and Bioelectronics* 63 (2015) 124–130.
www.elsevier.com/locate/bios.
- VENTURA, M.; GÓMEZ, A.; ANAYA, I.; DIAZ, J.; BROTO, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L.
Determination of aflatoxins B1, G1, B2, and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, New York, v.1048, p.25-29, 2004.
- VIEIRA, S.N. **Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção de hepatopatias.** Uberlândia, 2007. Dissertação de Mestrado (Mestre em Química). Universidade Federal de Uberlândia.
- VIEIRA, S. N.; **Desenvolvimento e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores eletroquímicos na detecção de compostos fenólicos.** Tese de Doutorado, 2011, Instituto de Química, UFU, Uberlândia.
- XIAN ZHANG, CHAO-RUI LI, WEI-CHENG WANG, JIAN XUE, YA-LING HUANG, XIAN-XIAN YANG, BIN TAN, XIPENG ZHOU, CHUANG SHAO, SHI-JIA DING, JING-FU QUI.
A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn using single-walled carbon nanotubes/chitosan. *Journal homepage:* www.elsevier.com/locate/foodchem, 2016.
- X. YANG, J. ZHENG, M. ZHEN, X. MENG, F. JIANG, T. WANG, C. SHU, L. JIANG, C. WANG,
A linear molecule functionalized multi-walled carbon nanotubes with well dispersed PtRu nanoparticles for ethanol electro-oxidation, *Appl. Catal. B Environ.* 121 (2012) 57–64.
- X. KAN, Y. ZHAO, Z. GENG, Z. WANG, J.-J. ZHU, **Composites of multiwalled carbon nanotubes and molecularly imprinted polymers for dopamine recognition,** *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 4849–4854.
- WANG, G. et al. **A Living Cell Quartz Crystal Microbalance Biosensor for Continuous Monitoring of Cytotoxic Responses of Macrophages to Single-Walled Carbon Nanotubes.** *Particle and Fibre Toxicology*, v.8, n.4, 2011.
- WANG, X. et al. **Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications.** *Exp Biol Med*, v.234, p.1128-1139, 2009.
- WANG, J.; CONSTABEL, C.P. **Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar.** *Phytochemistry*, Vol.64, p.115-221, 2003.

WANG, J.; MUSAMEH, M.; MERKOCI, A.; LIN, Y. **Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes**. *Electrochemistry Communications*, v. 4, p. 743-746, 2002.

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

WANG, J. **From DNA Biosensors to Gene Chips**. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.

WOGAN, G.N. **Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment**. *Progress in Clinical Biological Research*, New York, v.374, p.123-137, 1992.

WORCESTER, D. L.; MILLER, R. G.; BRYANT, P. J.; *J. Micros.* 1988, 152, 817.

WU, X.; CHEN, J.; WU, M. & ZHAO, J. X. **“Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy”**. *Theranostics*, v.5(4): p.322–344, 2015.

ZHANG,S.;SHEN,Y.;SHEN,GUANGYU.;WANG,S.SHEN.G.;YU,R. **Electrochemical immunosensor based on PdeAu nanoparticles supported on functionalized PDDA-MWCNT nanocomposites for aflatoxin B1 detection**. *Analytical Biochemistry* 494 (2016) 10 e 15.

ZHANG, D., LI, P., ZHANG, Q., ZHANG, W., HUANG, Y., DING, X., JIANG, J., 2009. *Analytica Chimica Acta* 636, 63–69.

ZHANG,S. WRIGHT,G. e YANG,Y.; **Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction** ; *Biosensors and Bioelectronics* 15,p.273-282,2000.

ZHOU, J. & ROSSI, J. J. **“Aptamer-targeted RNAi for HIV-1 therapy”**. *Met. Mol Biol.*, v.721: p.355-371, 2011.

YAGATI, A.K.; CHAVAN, S.G.; BAEK, CH.; LEE, M.; MIN, J. **Label-free impedance sensing of aflatoxin B1 with polyaniline nanofibers/Au nanoparticle electrode array**. *Sensors* 2018, 18(5), 1320.

YANG, W.; GOODING, J.J.; HIBBERT, D. B. **Characterisation of Gold Electrodes Modified with Self Assembled Monolayers of L-Cysteine for the Adsorptive Stripping Analysis of Copper**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*.v. 516, p. 10-16, 2001.

YOGESWARAN, U.; THIAGARAJAN, S.; CHEN, Shen-Ming. **Recent Updates of DNA Incorporated in Carbon Nanotubes and Nanoparticles for Electrochemical Sensors and Biosensors**. *Sensors*, v.8, p.7191-7212, nov 2008.

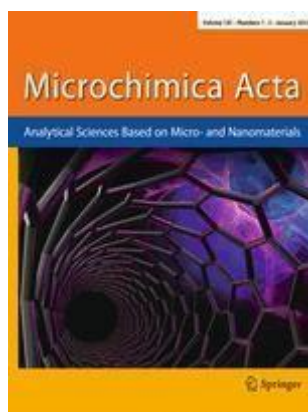
YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. **Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases**. *Revista Iberoamericana de Micologia*, Bilbao, v.22, p.194-202, 2005.

YOU K. M., LEE S. H., LEE B. S. **Aptamers as Funcional Nucleic Acids: In vitro Selection and Biotechnological Applications.** Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 8, p. 64-75, 2003.

APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA MICROCHIMICA ACTA**Impedimetric immunoassay for aflatoxin B1 using a cysteine modified gold electrode with covalently immobilized carbon nanotubes.**

Artigo publicado no periodico: **MICROCHIMICA ACTA**

(Volume 184, Issue 9, pp 3205–3213, 2017)



Fator de impacto: 4,580



Impedimetric immunoassay for aflatoxin B1 using a cysteine modified gold electrode with covalently immobilized carbon nanotubes

Maurilia P. Costa¹ · Isaac A. M. Frias² · Cesar A. S. Andrade^{2,3} · Maria D. L. Oliveira^{2,3}

Received: 17 December 2016 / Accepted: 26 April 2017
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract The authors describe a label-free electrochemical biosensor based on CNTs for picogram range detection of the food carcinogen aflatoxin B1 (AFB1). A gold electrode was modified with a cysteine (Cys) self-assembled layer, and carboxyl-functionalized carbon nanotubes were covalently attached to Cys for the subsequent tethering of antibody against AFB1 (anti-AFB1). Topographical images of the biosensor surface were acquired by atomic force microscopy throughout the modification and assay procedure. Upon exposure to samples containing AFB1, its binding to anti-AFB1 will result in a change in electrical conductivity. The use of CNT warrants enhanced electrical properties, and the charge-transfer resistance (R_{ct}) can be related to the concentration of AFB1. Biosensor selectivity was tested by using samples containing ochratoxin A. The electrode displays a limit of detection as low as $0.79 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$, and response is linear in the 0.1 to $20 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ concentration range. The assay was applied to the determination of AFB1 in contaminated corn flour at concentrations so low that they cannot be quantified by established ELISAs. In our

perception, this method represents a viable point-of-care probe for detection of AFB1.

Keywords Aflatoxin B1 · Nanobiosensor · Immunoreaction · Mycotoxin · ELISA

Introduction

Aflatoxin B1 (AFB1), produced by *Aspergillus* fungi of the genus *flavus* and *parasiticus* [2] is considered the most toxic aflatoxin and potential carcinogen classified in Group 1 according to International Agency for Research on Cancer [3]. Foodstuff and animal feed [4] including cereals, legumes, groundnut and corn have important role as complementary foods and are extremely vulnerable to AFB1 contamination [5]. International maximum limits for aflatoxins present in foodstuff are $50 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ applied for food safety and health of the population [6]. In European countries, the highest permissible AFB1 concentration for food intended for direct human consumption is $10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. For instance, its maximum tolerated level in maize is $5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, whereas in other foods as milk the limit is set to $5 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ [7–9].

Thin layer chromatography, liquid chromatography, immunoaffinity chromatography, high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are the most widely employed analytical techniques for the identification and quantification of aflatoxins [10]. Additionally, immunoassays are recognized as highly sensitive for AFB1 assessment in food and agricultural products. The lowest reported LOD for AFB1 using ELISA kits is $2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ [11]. However, these methods are time consuming, require special equipment, trained

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00604-017-2308-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Maria D. L. Oliveira
m_danielly@yahoo.com.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

personnel and additional pretreatment of the sample. As a result, biosensors arise as an essential alternative developed to be rapid, practical and economical methods towards AFB1 detection. Besides specific antigen-antibody immunoreaction, other receptors such as aptamers are emerging. Aptamers are single-stranded oligonucleotides specifically raised to target molecules [12]. Although their production is easier and less expensive in comparison to antibodies, antibody industrial production is already largely established and therefore easier to implement. Several nanomaterials are used as supporting transducers or tracers that amplify the detection signal of immunosensors and immunoassays, recent results are summarized in a thorough review [13]. Carbon nanotubes (CNT) are nanoparticles exhibiting exceptional surface/volume ratio that enables improved immobilization of biomolecules for the development of sensor devices. Additionally, carbon nanostructures can be multifunctionalized to be used as suitable scaffolds to tether molecular probes onto them. In the last five years, CNT-conjugates have been employed as biosensing platforms to detect and transduce the recognition response of cell-surface glycans [14, 15], enzymes and protein receptors [16], DNA and chylomicrons [17, 18]. However, CNT-based immunosensors are considered to be still in the early stage of development, requiring further investigation [19]. Recently, it has been demonstrated that multiwall CNT transducers enhance oxidation signals [20], thus propelling electrochemical CNT-based biosensors development.

The present work describes the construction of a label-free electrochemical immunosensor based in carboxyl-functionalized multiwall carbon nanotubes for detecting AFB1 in corn flour samples. A homogeneously distributed self-assembled cysteine (Cys) layer proved to be an efficient linker for CNT. AFB1 monoclonal antibodies (anti-AFB1) are directly tethered to the nanostructured film by covalent linkages. Sensitivity and selectivity of the biosensor were studied by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM). Interference was studied by testing ochratoxin A (OTA) contaminated corn flour samples. OTA is a nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin produced by species of *Aspergillus* in warmer climates of the South America and Africa. Compared to current immunological methods, the system is fast to construct, selective and stands out as a highly sensitive point-of-probe monitoring biosensor. It may help agricultural producers to enhance the yield of current crop stocking methods. Other methods such as immunochromatographic strips [42] are also easier to use and simpler to analyze, although their sensitivity and limit of detection (LOD) prevents their use as monitoring tools, since their positive result would represent the loss of the product.

Experimental

Materials

Potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), multiwalled CNT, bovine serum albumin (BSA), Cys, monoclonal antibody anti-AFB1, AFB1 and OTA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA <http://www.sigmaaldrich.com>). Corn flour samples contaminated with AFB1 and OTA were purchased from Neogen Food Safety (Lansing, USA <http://foodsafety.neogen.com>). All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received, without further purification.

Construction of the immunosensing platform

A gold electrode (BGE) was polished with 0.05 μm $\alpha-Al_2O_3$ paste and carefully cleaned by rinsing and set in an ultrasonic bath in ultrapure water for 10 min. Cleaning procedure was repeated each time after exposure to samples during electrochemical characterization and testing. Modification process of Cys-CNT-Anti-AFB1-BSA-modified electrode is shown in Fig. 1. Initially, 3 μL of a 15 mM Cys solution was carefully dropped over the BGE and allowed a 20-min incubation time at 25 °C to create a self-assembled layer (Fig. SI.1). Subsequently, the electrode was set in an ultrasound bath for 1 min. Cys-CNT system was constructed by wise-dropping 3 μL of an aqueous solution containing carboxyl-CNT diluted in a 1:1 of a EDC (0.4 M), NHS (0.1 M), and carefully incubated for 50 min at 25 °C. Afterwards, 3 μL of a 25 mg mL⁻¹ Anti-AFB1 solution diluted in 1:1 EDC: NHS was added dropwise over the activated platform and let to incubate for 40 min at 25 °C (Fig. SI.2.). Finally, the remaining nonspecific sites were blocked with 1 μL of a 10% w/v BSA solution incubated for 5 min. After this point, the biosensor is ready to be exposed to AFB1 samples.

Detection of AFB1 in standard and corn flour samples

The biosensing ability of the Cys-CNT-Anti-AFB1-BSA-modified electrodes was evaluated by use of standard solutions adjusted at different concentrations of pure AFB1 [0.1, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, 11.0 and 20.0 pg g⁻¹], 2 μL were added dropwise and let to incubate for 15 min at 25 °C. Corn flour samples spiked with AFB1 (0.1, 5.0, 9.0, 11.0 and 15.0 pg g⁻¹ concentrations) were used to evaluate the sensitivity of the sensor. In addition, corn flour samples spiked with OTA [0.1, 5.0, 10.0 and 15.0 pg g⁻¹] were used as negative control to evaluate the specificity of the immunosensor. Validated protocols detailing aflatoxin extraction from grain samples usually appoints methanol or water-methanol solutions as solvents [21]. Thus, to

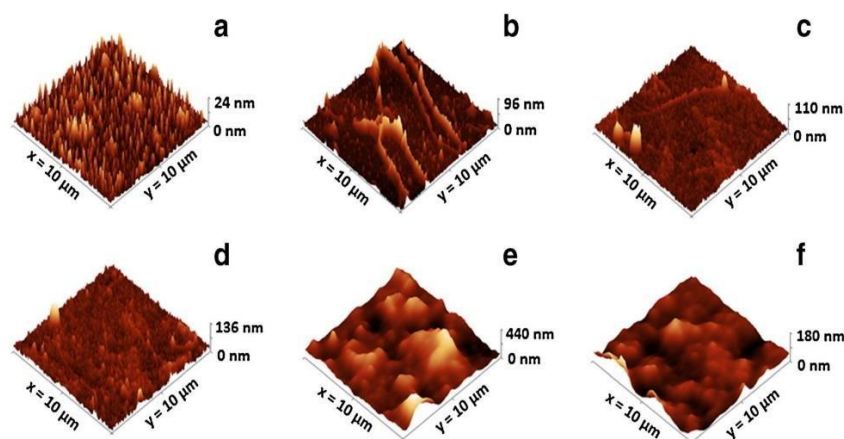


Fig. 2 3D AFM images of Cysteine SAM (a), Cys-CNT (b), Cys-CNT-Anti-AFB1 (c), Cys-CNT-Anti-AFB1-BSA (d), Cys-CNT-Anti-AFB1-BSA-AFB1 as positive sample (e) and Cys-CNT-Anti-AFB1-BSA-OTA as negative sample (f). Scan area of $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$

behavior confirms that, even after being adsorbed on the surface of carbon nanotubes, Anti-AFB1 retained its bioactivity. As an experiment control, the surface of the Cys-CNT-Anti-AFB1-BSA immunosensor after being exposed to an OTA-contaminated corn flour sample at $15.0\ \text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ concentration (Fig. 2f) is shown. As expected, no significant height change was observed. Thus, the specificity of the constructed immunosensor towards other mycotoxins is verified.

Electrochemical characterization

After each assembly step, one can observe an increase in the diameter of the Nyquist semicircle that is directly related to the Rct. The response is a result of the antigen-antibody complex, thus contributing to our findings about the maintenance of Anti-AFB1 bioactivity, even after being adsorbed on the surface of carbon nanotubes [30]. The BGE impedimetric response is mainly related to diffusion processes with Rct values equivalent to $249\ \Omega$. Cys-CNT-Anti-AFB1 system presents an increase in impedimetric response ($R_{\text{ct}} = 4.03\ \text{k}\Omega$) due to a shielding effect of the layer avoiding the electrochemical probe transfer. Next, when the immunosensor is exposed to an AFB1 positive sample, the captured molecules provide an additional blocking layer that decreases the redox probe flux nearby the transducer.

Changes in voltammetric behavior during the construction stages of the biosensor are shown in Fig. 3b. The initial BGE signal presents a reversible voltammogram compatible to the response of the redox probe. Thus, diffusion processes control the reactions that lead the electron transfer. After modifying the electrode to obtain the immunosensor, we notice a decrease in the amperometric response in accordance with the hampered motility of the redox probe towards the transducer found in the impedimetric results. After exposing the

immunosensor to an AFB1 sample, a drastic decrease of the oxidation/reduction signals is observed, including a separation of the anodic and cathodic peaks. Despite the observed quasi-reversible behavior, the gathered results suggest that the deceleration of the redox couple transfer rate towards the transducer is proportional to the amount of surface coating.

Sensitivity of the immunosensor

To assess reproducibility and standard experimental deviation (S.D.), the following data is presented as the result of three replicates performed for each sample. Sensitivity was evaluated by creating a calibration curve from the EIS responses resulting from the exposure of the immunosensor to pure standard AFB1 samples.

In Fig. 4a we present the impedimetric responses of the immunosensor after its exposure to AFB1 standard solutions at the following concentrations: 0.1, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, 11.0, 15.0 and $20.0\ \text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$. The scattered points represent the experimental results while the solid black lines show the fitting curves resultant from the equivalent circuit (Fig. 4a). From the first sample detection ($0.1\ \text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$), one can see a gradual increase in Rct resistance from 6.97 to $84.33\ \text{k}\Omega$ ($20.0\ \text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$).

The results of modeled the data with basis in the equivalent circuit are shown in Table SI.1. Since the most altered parameter is the Rct, it is convenient to evaluate the antigen-antibody interaction in terms of the relative variation of the Rct as defined by:

$$\% \Delta R_{\text{ct}} = \left| \frac{R_{\text{ct}}^{\text{CNT-antiAFB1-AFB1}} - R_{\text{ct}}^{\text{CNT-antiAFB1}}}{R_{\text{ct}}^{\text{CNT-antiAFB1}}} \right| \times 100 \quad ,$$

According to this equation, the $R_{\text{ct}}^{\text{CNT-antiAFB1}}$ corresponds to the initial immunosensor response and $R_{\text{ct}}^{\text{CNT-antiAFB1-AFB1}}$

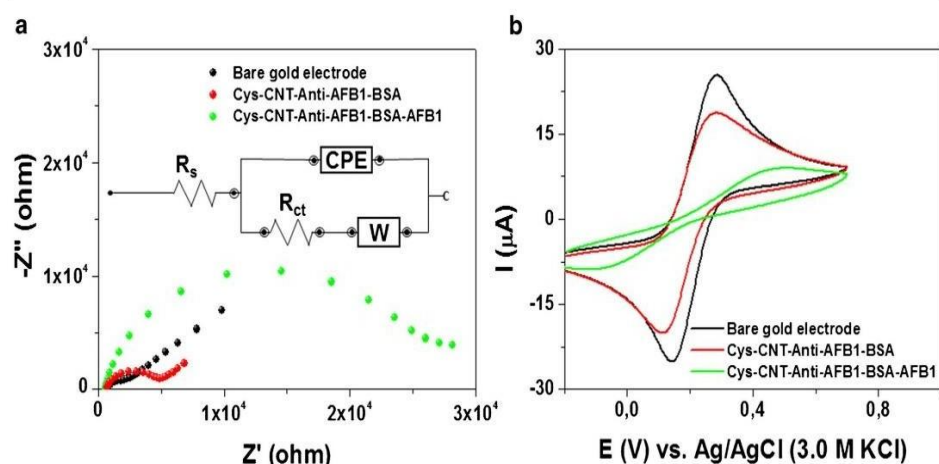


Fig. 3 Nyquist plots (a) and cyclic voltammograms (b) for each step in the assembling of the immunosensor. Inset: Equivalent circuit used to fit the impedance results

is the charge transfer resistance of the biosensor response after its interaction with AFB1. Sensitivity and reproducibility were assessed from the relationship existing between ΔR_{ct} % and the concentration of AFB1 and its plot is shown in Fig. 4b. The linear relationship was modelled by $\Delta R_{ct} \% = 98.19 + 92.38 [\text{AFB1 pg g}^{-1}]$ with a coefficient of determination of 0.99. From the impedimetric analysis, LOD was estimated based on the S.D. of the responses and the calculated slope as follows: $\text{LOD} = 3.3 \sigma \cdot s^{-1}$. In this expression, s is the slope of the calibration curve and σ is the S.D. of the intercept of the regression line. The LOD value obtained (0.79 pg g^{-1}) was a lower value than that found in current AFB1 tests run by ELISA (2 pg g^{-1}) and lower than recent AFB1-detecting molecular biosensors ranging from 3.5 pg g^{-1} to 5 ng g^{-1} [25, 31–35].

Selectivity of the immunosensor, analysis of corn flour samples

Selectivity was assessed by testing the immunosensor towards corn flour samples contaminated with AFB1 for positive samples and OTA for negative samples. Figure 5a presents the impedimetric responses of the immunosensor after exposure to corn flour samples contaminated with AFB1 at different concentrations [$0.1, 5.0, 9.0, 11.0, 15.0 \text{ pg g}^{-1}$]. The incubation of the immunosensor with AFB1 samples resulted in an increase of the R_{ct} , this behavior is associated to the redox probe being obstructed in its way towards the transducer interface.

The experimental bioactivity was analyzed through $\Delta R_{ct}\%$ responses related to the concentration of the mycotoxins.

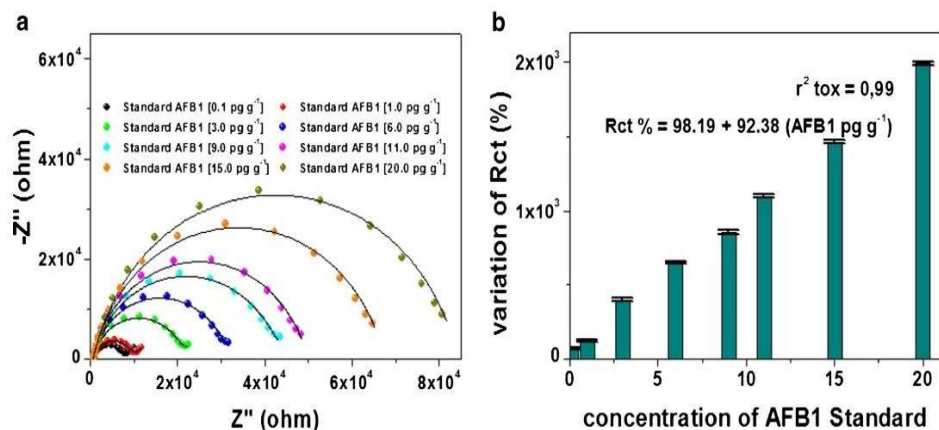


Fig. 4 Nyquist plots (a) and histogram of ΔR_{ct} (%) of the immunosensor (b) after exposure to different concentrations of AFB1 standard $0.1, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, 11.0, 15.0$ and 20.0 pg g^{-1} .

Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are reported as the mean values $\pm$ their half-deviation (less than 1%)

Fig. 5 Nyquist plots (a) and histogram showing the ΔR_{ct} (%) of the immunosensor after exposure to corn flour infected with AFB1 as positive samples [0.1, 5.0, 9.0, 11.0 and 15.0 pg g^{-1}] (b) and with OTA as negative samples [0.1, 5.0, 10.0 and 15.0 pg g^{-1}] (c). Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are reported as the mean values $\pm$ their half deviation (less than 1%)

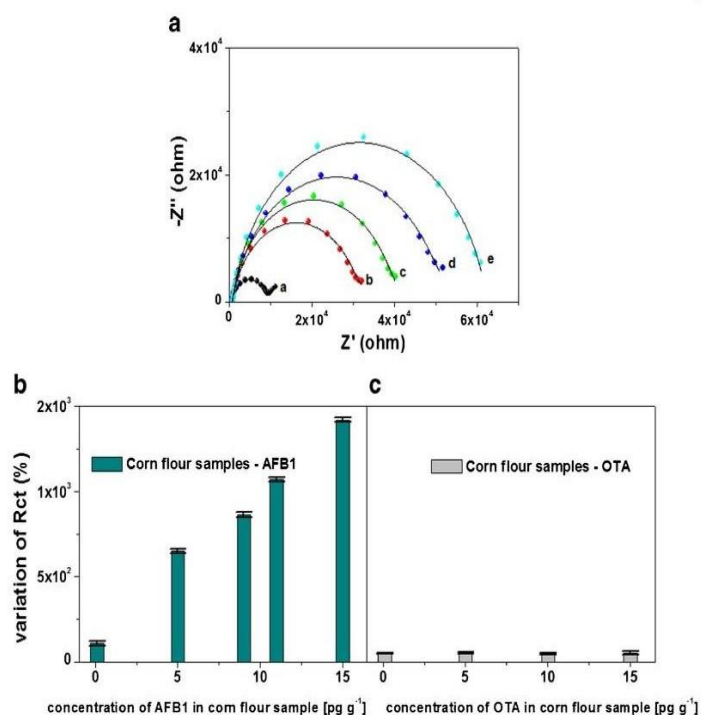


Table 1 Comparison of some analytical features of Label-Free CNT immunosensor for AFB1 to those of other immunosensors

Detection technique	Sensor type	Assay platform	Linear range	LOD	Construction/measure (t)	Ref
Electrochemical	immunosensor	Graphene/conducting polymer/ gold Np/ionic liquid composite film	$3.2\text{--}32 \text{ fg mL}^{-1}$	312 ag mL^{-1}	27 h/15 min	[40]
Electrochemical	immunosensor	SWCNT /chitosan	$0.01\text{--}100 \text{ ng mL}^{-1}$	3.5 pg mL^{-1}	2 h/3.5 h	[31]
Electrochemical	immunoassay	Printed carbon electrode	$0.125\text{--}16 \text{ ng mL}^{-1}$	125 pg mL^{-1}	3 h/15 min	[41]
Electrochemical	immunosensor	MWCNT /Polymer/Pd-Au nanoparticles	$0.05\text{--}25 \text{ ng mL}^{-1}$	30 pg mL^{-1}	3 h/15 min	[23]
Surface plasmon resonance	immunosensor	Polymeric brushes/Au nanoparticles (NPs)	0.1 ng/mL , $\mu\text{g mL}^{-1}$	18 pg mL^{-1}	13 h/55 min	[33]
Mechanical immunosensor	immunosensor	Gold surface	$0.1\text{--}50 \text{ ng mL}^{-1}$	30 pg mL^{-1}	2 days/1 h	[34]
Optical/ fluorescence	immunosensor	Planar waveguide	$73\text{--}400 \text{ pg mL}^{-1}$	45 pg mL^{-1}	5 h/20 min	[35]
Fluorescence	immunoassay	Quantum dots	$0.1\text{--}0.6 \mu\text{mol mL}^{-1}$	0.2 pmol mL^{-1}	8 h/3 min	[12]
Immunochromatographic strip	immunoassay	Nitrocellulose/ Antibodies	-	0.1 ng mL^{-1}	5 min	[42]
Portable electrochemical	immunosensor	Gold surface	$5\text{--}20 \text{ ng mL}^{-1}$	5 ng mL^{-1}	4 h/1 h	[25]
Electrochemical impedance	Aptasensor	Thiolated aptamers	$0.1\text{--}100 \text{ nmol mL}^{-1}$	0.12 ng mL^{-1}	-	[43]
Differential pulse voltammetry	Aptasensor	Printed/ magnetic Nps-Biotin Aptamer	$1\text{--}50 \text{ ng mL}^{-1}$	0.11 ng mL^{-1}	-	[44]
Differential pulse voltammetry	Aptasensor	Thiolated aptmers/ labeled Fe	$0.005\text{--}10 \text{ ng mL}^{-1}$	0.001 ng mL^{-1}	-	[45]
Electrochemical impedance	Immunosensor	Covalent/ Cys-MWCNT-AcAFB1	$0.1\text{--}20 \text{ pg mL}^{-1}$	0.79 pg mL^{-1}	2 h/15 min	This work

Figure 5b shows the bioactivity of positive samples of corn flour contaminated with AFB1. In addition, the impedimetric result for negative samples of corn flour contaminated with OTA at different concentrations [0.1, 5.0, 10.0 and 15.0 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$] is shown in Fig. 5c. Blue columns represent the $\Delta\text{Rct}\%$ found for AFB1 samples. As it can be observed, there is a large linear variation of the Rct from 107.9% to 1421.1% for the immunosensors exposed to AFB1 samples. On the other hand, the immunosensors exposed to OTA samples presented almost unchangeable $\Delta\text{Rct}\%$, even at increasing concentrations, with 49.43% as mean value. This behavior categorically supports the selectiveness of our immunosensors besides supporting our findings about the maintenance of Anti-AFB1 bioactivity even after being covalently-immobilized onto the surface of the carbon nanotubes.

It is important to highlight that not all reported electrochemical platforms developed to detect AFB1 consider covalent immobilization of the antibody to the carbon material itself. For instance, in Table 1 we compare some analytical features of our system to those of other immunosensors. Of note, although physicochemical interactions are preferred, CNT-based transducers are relatively easy and fast to construct. Carbon-based transducers are the preferred option for electrochemical immunosensors. In addition, the reported time for a complete detection in these methods is also fast. The development of this immunosensor asserts the direct covalent immobilization of Anti-AFB1 to the CNT by initially constructing a dense Cys SAM that is able to immobilize a considerable amount of CNT nanostructures, increasing thus the amount of sites available for Anti-AFB1 binding. The presented methodology dispenses the use of unspecific ionic interactions to immobilize CNT as it is currently done with ionic matrixes, thus resting in CNT electrical properties [36, 37]. For the most probable, the simplicity and precision of our mounting methodology is essential to attain a $0.79\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ LOD. In addition, our methodology was found to be among the mean preparation time of current electrochemical immunosensors with 2 h for construction and 15 min detection. Furthermore, our immunosensor was also comparable with other LOD reports on commercial AFB1 ELISA kits [38] (MyBioSource: $250\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$; Quicking Biotech: $100\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$; MaxSignal: $50\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$; Diagnostic Automation: $5\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$). It's worth highlighting that our system revealed a good sensitivity and performance when compared with sensors based on aptamers. In addition, some authors revealed that aptamer systems possesses difficult to detect AFB1 in real samples at low concentrations. Finally, the interest in using carbon nanomaterials in electrochemical platforms continues to grow at a fast pace [39], and improving their performance is essential to attain the sensitivity once predicted by theoretical works.

Conclusions

In this paper, we have presented a simple and sensitive impedimetric immunosensor for AFB1 detection based in a cysteine self-assembled layer, which was used for the covalent anchoring of carboxyl-functionalized CNTs. Compared to other nanostructured immunosensors, the preparation of our platform is simple and efficient. We improved the nanostructuration of the immunosensor by employing covalent interaction of the platform with the substrate, as a manner of increasing the resistance to peeling off. In this context, the incubation time and temperature control are critical parameters to attain the initial dense Cys film on which the subsequent tethering depend. Electrochemical characterization, CV and EIS, conjointly with AFM topographical analyses confirmed that the bioactivity of the antibodies is maintained after their covalent immobilization while maintaining high specificity towards AFB1. The system is sufficiently sensitive to dismiss the use of signal amplifiers. Despite improvements in terms of fast construction, surface coverage optimization and high specificity, our immunosensor is still difficult to regenerate working as a single time analysis, and therefore, the system has to be constructed from scratch each time before use. When compared to current traditional methods and alternative immunological biosensors, our biosensor showed fast fabrication (2 h) and operation (15 min) besides acceptable reproducibility ($\text{RSD} < 5\%$). When testing AFB1 standards, the biosensor performed with a low LOD of $0.79\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ and a linear detection range between 0.1 to $20\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$. Such level of sensitivity in a portable label-free detector would facilitate in-field use, or for instance, alternative continuous quality monitoring of crop storages.

Acknowledgements The authors are grateful for support from the Rede de Nanobiotecnologia/CAPES, INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica), CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9) and FACEPE. Palmeira and Frias would like to thank CAPES for a PhD and postdoctoral scholarships, respectively. The manuscript was written through contributions from all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Abdel-Aziz SM, Asker MMS, Keera AA, Mahmoud MG (2016) Microbial food spoilage: control strategies for shelf life extension. In: Garg N, Abdel-Aziz MS, Aeron A (eds) *Microbes in food and health*. Springer International Publishing, Cham, pp 239–264. doi:10.1007/978-3-319-25277-3_13
2. Adebo OA, Njobeh PB, Gbashi S, Nwinyi OC, Mavumengwana V (2015) Review on microbial degradation of aflatoxins. *Crit Rev Food Sci Nutr*:00–00. doi:10.1080/10408398.2015.1106440

3. Lee J, Her J-Y, Lee K-G (2015) Reduction of aflatoxins (B1, B2, G1, and G2) in soybean-based model systems. *Food Chem* 189:45–51. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.013
4. Shephard GS (2016) Current status of mycotoxin analysis: a critical review. *J AOAC Int* 99(4):842–848. doi:10.5740/jaoacint.16-0111
5. Temba MC, Njobeh PB, Kayitesi E (2017) Storage stability of maize-groundnut composite flours and an assessment of aflatoxin B1 and ochratoxin A contamination in flours and porridges. *Food Control* 71:178–186. doi:10.1016/j.foodcont.2016.06.033
6. De Saeger S, Audenaert K, Croubels S (2016) Report from the 5th International symposium on mycotoxins and toxigenic Moulds: challenges and perspectives (MYTOX) held in Ghent, Belgium, May 2016. *Toxins* 8(5):146. doi:10.3390/toxins8050146
7. Juan C, Raiola A, Mañes J, Ritieni A (2014) Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control* 39:227–236. doi:10.1016/j.foodcont.2013.10.036
8. Khayoon WS, Saad B, Lee TP, Salleh B (2012) High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in chilli, peanut and rice using silica based monolithic column. *Food Chem* 133(2):489–496. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.010
9. Fu Z, Huang X, Min S (2008) Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J Chromatogr A* 1209(1–2):271–274. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.054
10. Selvaraj JN, Zhou L, Wang Y, Y-j Z, F-g X, X-f D, Liu Y (2015) Mycotoxin detection — recent trends at global level. *J Integr Agric* 14(11):2265–2281. doi:10.1016/S2095-3119(15)61120-0
11. Schwartzbord J, Severe L, Brown D (2016) Detection of trace aflatoxin M1 in human urine using a commercial ELISA followed by HPLC. *Biomarkers*:1–4. doi:10.1080/1354750X.2016.1203998
12. Lu Z, Chen X, Wang Y, Zheng X, Li CM (2015) Aptamer based fluorescence recovery assay for aflatoxin B1 using a quencher system composed of quantum dots and graphene oxide. *Microchim Acta* 182(3):571–578. doi:10.1007/s00604-014-1360-0
13. Wang X, Niessner R, Tang D, Knopp D (2016) Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins. *Anal Chim Acta* 912:10–23. doi:10.1016/j.aca.2016.01.048
14. Reichardt NC, Martin-Lomas M, Penades S (2013) Glyconanotechnology. *Chem Soc Rev* 42(10):4358–4376. doi:10.1039/C2CS35427F
15. Andrade CAS, Nascimento JM, Oliveira IS, de Oliveira CVJ, de Melo CP, Franco OL, Oliveira MDL (2015) Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavarin A for bacterial detection. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 135:833–839. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.03.037
16. Luo X, Davis JJ (2013) Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chem Soc Rev* 42(13):5944–5962. doi:10.1039/C3CS60077G
17. Saxena U, Das Asim B (2016) Nanomaterials towards fabrication of cholesterol biosensors: key roles and design approaches. *Biosens Bioelectron* 75:196–205. doi:10.1016/j.bios.2015.08.042
18. Yang N, Chen X, Ren T, Zhang P, Yang D (2015) Carbon nanotube based biosensors. *Sensors Actuators B: Chemical* 207, Part A:690–715. doi:10.1016/j.snb.2014.10.040
19. Tilmaci C-M, Morris MC (2015) Carbon nanotube biosensors. *Front Chem* 3:59. doi:10.3389/fchem.2015.00059
20. Shobha BN, Muniraj NJR (2015) Design, modeling and performance analysis of carbon nanotube with DNA strands as biosensor for prostate cancer. *Microsyst Technol* 21(4):791–800. doi:10.1007/s00542-014-2281-x
21. Asghar MA, Iqbal J, Ahmed A, Khan MA, Shamsuddin ZA, Jamil K (2016) Development and validation of a high-performance liquid chromatography method with post-column derivatization for the detection of aflatoxins in cereals and grains. *Toxicol Ind Health* 32(6):1122–1134. doi:10.1177/0748233714547732
22. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT (2001) Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67(7):3086–3091. doi:10.1128/AEM.67.7.3086-3091.2001
23. Zhang S, Shen Y, Shen G, Wang S, Shen G, Yu R (2016) Electrochemical immunosensor based on Pd–Au nanoparticles supported on functionalized PDPA-MWCNT nanocomposites for aflatoxin B1 detection. *Anal Biochem* 494:10–15. doi:10.1016/j.ab.2015.10.008
24. Luna DMN, Avelino KYPS, Cordeiro MT, Andrade CAS, Oliveira MDL (2015) Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. *Sensors Actuators B Chem* 220:565–572. doi:10.1016/j.snb.2015.05.067
25. Li Z, Ye Z, Fu Y, Xiong Y, Li Y (2016) A portable electrochemical immunosensor for rapid detection of trace aflatoxin B1 in rice. *Anal Methods* 8(3):548–553. doi:10.1039/C5AY02643A
26. Yu L, Zhang Y, Hu C, Wu H, Yang Y, Huang C, Jia N (2015) Highly sensitive electrochemical impedance spectroscopy immunosensor for the detection of AFB1 in olive oil. *Food Chem* 176:22–26. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.030
27. Nečas D, Klapetek P (2012) Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics* 10(1):181–188
28. Simão EP, Barbieri GJLS, Andrade CAS, Oliveira MDL (2016) Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin B1 in Rice. *J Braz Chem Soc* 27:1040–1047
29. Huayhuas-Chipana BC, Gomero JCM, Sotomayor MDPT (2014) Nanostructured screen-printed electrodes modified with self-assembled monolayers for determination of metronidazole in different matrices. *J Braz Chem Soc* 25:1737–1745
30. Takeda S, Shagyo A, Sakoda Y, Ishii A, Sawamura M, Sueoka K, Kida H, Mukasa K, Matsumoto K (2005) Application of carbon nanotubes for detecting anti-hemagglutinins based on antigen–antibody interaction. *Biosens Bioelectron* 21(1):201–205. doi:10.1016/j.bios.2004.08.030
31. Zhang X, Li C-R, Wang W-C, Xue J, Huang Y-L, Yang X-X, Tan B, Zhou X-P, Shao C, Ding S-J, Qiu J-F (2016) A novel electrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 in corn using single-walled carbon nanotubes/chitosan. *Food Chem* 192:197–202. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.044
32. Lou X, Zhu A, Wang H, Wu J, Zhou L, Long F (2016) Direct and ultrasensitive optofluidic-based immunosensing assay of aflatoxin M1 in dairy products using organic solvent extraction. *Anal Chim Acta* 940:120–127. doi:10.1016/j.aca.2016.08.020
33. Karczmarczyk A, Dubiak-Szepietowska M, Vorobii M, Rodriguez-Emmenegger C, Dostálák J, Feller K-H (2016) Sensitive and rapid detection of aflatoxin M1 in milk utilizing enhanced SPR and p(HEMA) brushes. *Biosens Bioelectron* 81:159–165. doi:10.1016/j.bios.2016.02.061
34. Zhou X, Wu S, Liu H, Wu X, Zhang Q (2016) Nanomechanical label-free detection of aflatoxin B1 using a microcantilever. *Sensors Actuators B Chem* 226:24–29. doi:10.1016/j.snb.2015.11.092
35. Guo H, Zhou X, Zhang Y, Song B, Zhang J, Shi H (2016) Highly sensitive and simultaneous detection of melamine and aflatoxin M1 in milk products by multiplexed planar waveguide fluorescence immunosensor (MPWFI). *Food Chem* 197, Part A:359–366. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.109
36. Kachosangi RT, Musameh MM, Abu-Yousef I, Yousef JM, Kanan SM, Xiao L, Davies SG, Russell A, Compton RG (2009) Carbon nanotube–ionic liquid composite sensors and biosensors. *Anal Chem* 81(1):435–442. doi:10.1021/ac801853r
37. Wang X, Hao J (2016) Recent advances in ionic liquid-based electrochemical biosensors. *Sci Bull* 61(16):1281–1295. doi:10.1007/s11434-016-1151-6
38. Li Q, Lv S, Lu M, Lin Z, Tang D (2016) Potentiometric competitive immunoassay for determination of aflatoxin B1 in food by using

- antibody-labeled gold nanoparticles. *Microchim Acta* 183(10): 2815–2822. doi:10.1007/s00604-016-1929-x
39. Reverté L, Prieto-Simón B, Campàs M (2016) New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review. *Anal Chim Acta* 908:8–21. doi:10.1016/j.aca.2015.11.050
 40. Linting Z, Ruiyi L, Zaijun L, Qianfang X, Yinjun F, Junkang L (2012) An immunosensor for ultrasensitive detection of aflatoxin B1 with an enhanced electrochemical performance based on graphene/conducting polymer/gold nanoparticles/the ionic liquid composite film on modified gold electrode with electrodeposition. *Sensors Actuators B Chem* 174:359–365. doi:10.1016/j.snb.2012.06.051
 41. Yugender Goud K, Catanante G, Hayat A, M S, Vengatajalabathy Gobi K, Marty JL (2016) Disposable and portable electrochemical aptasensor for label free detection of aflatoxin B1 in alcoholic beverages. *Sensors Actuators B Chem* 235:466–473. doi: 10.1016/j.snb.2016.05.112
 42. Masinde LA, Sheng W, Xu X, Zhang Y, Yuan M, Kennedy IR, Wang S (2013) Colloidal gold based immunochromatographic strip for the simple and sensitive determination of aflatoxin B1 and B2 in corn and rice. *Microchim Acta* 180(9):921–928. doi:10.1007/s00604-013-1008-5
 43. Castillo G, Lamberti I, Mosiello L, Hianik T (2012) Impedimetric DNA Aptasensor for sensitive detection of Ochratoxin A in food. *Electroanalysis* 24(3):512–520. doi:10.1002/elan.201100485
 44. Barthelmebs L, Hayat A, Limiadi AW, Marty J-L, Noguier T (2011) Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sensors Actuators B Chem* 156(2):932–937. doi:10.1016/j.snb.2011.03.008
 45. Tong P, Zhang L, Xu J-J, Chen H-Y (2011) Simply amplified electrochemical aptasensor of Ochratoxin A based on exonuclease-catalyzed target recycling. *Biosens Bioelectron* 29(1):97–101. doi: 10.1016/j.bios.2011.07.075

APÊNDICE B- PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

COSTA, M. P.; FRIAS, I. A. M.; Andrade, C.A.S.; Oliveira, M.D.L. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR. 2016, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201601965, título: "DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR".

Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depósito: 25/08/2016.

 INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL	25/08/2016 879180940011 15/15  (00.000.2.2.16.0178872.4)
Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT	
Número do Processo: BR 10 2016 019655 8	
Dados do Depositante (71)	
Depositante 1 de 1	
Nome ou Razão Social: Universidade Federal de Pernambuco	

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): DISPOSITIVO IMUNOELETRQUÍMICO BASEADO EM NANOSTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

Resumo: A invenção apresentada emprega um método inovador de construção de um dispositivo imunoeletrquímico para ser utilizado como ferramenta na identificação de toxinas presente em alimentos e essa detecção ocorre em concentrações na faixa de picogramas por mililitro. Destacando que o dispositivo apresentado não utiliza moléculas orgânicas ou inorgânicas sulfonadas, de difícil descarte e/ou de alta toxicidade para o meio ambiente. O método empregado é o de química malhada por etapas, para que ocorra uma correta deposição dos analitos na superfície do dispositivo. Além de ser uma ferramenta de baixo custo, análise rápida e em tempo real.

Figura a publicar: 05

**DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM
NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS
AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR**

01 Campo da Invenção

02 O processo aqui apresentado é um método para formular e construir dispositivos biossensores baseados em nanoestruturas de carbono e o aminoácido sulfurado cisteína ou qualquer outra biomolécula sulfurada para a imobilização de imunoglobulinas, sendo estendido a aptâmeros, proteínas ligantes a hidratos de carbono ou quaisquer outras biomoléculas que, natural ou artificialmente, sejam criadas ou selecionadas para reconhecer moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar. Nesta patente, destacamos dispensar o uso de moléculas orgânicas ou inorgânicas sulfuradas, de difícil descarte e/ou de alta toxicidade para o meio ambiente, as quais são rotineiramente utilizadas como ligantes entre a camada transdutora e superfícies metálicas, óxido metálicas ou derivadas de carbono durante o desenvolvimento de superfícies biossensoras.

03 A presente invenção é relevante para as mais diversas aplicações e desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico conhecidos como imunossensores eletroquímicos nanoestruturados, com ênfase nos constituídos por materiais carboxilados ou aminados. Outrossim, refere-se a métodos e composições para detecção de uma ou mais moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar quando encontradas em concentrações mínimas na faixa de picograma por mililitro. Este método de detecção pode ser classificado dentro do grupo dos nanossensores pois sua capacidade de detecção depende da aplicação de estruturas de carbono em nanoescala, cuja função é a de constituir a camada transdutora. Já a especificidade sensora está relacionada diretamente com o uso de

anticorpos, criados ou selecionados, para reconhecer moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar.

04 Sumário

05 A presente patente descreve procedimentos e metodologias para promover a modificação química de eletrodos metálicos ou óxido metálicos com a intenção de serem utilizados como plataformas em sensores eletroquímicos impedimétricos. Com esta finalidade, é descrito um método de química molhada por etapas. Para isso, deve ser realizada a imobilização covalente de uma camada de bioreconhecimento na superfície transdutora nanoestruturada. Por sua vez, a nanoestrutura deve se encontrar previamente ligada covalentemente à superfície de um eletrodo metálico ou óxido metálico por meio do uso de biomoléculas contendo grupos funcionais livres para serem aproveitados em ligações covalentes ou então, utilizando quaisquer métodos de ancoragem que empreguem os defeitos atômicos da rede cristalina do substrato a ser empregado.

06 Anterioridades: Estado da Técnica

07 A classificação dos perigos alimentares é feita, principalmente, com base na natureza biológica, química ou física. Dentre os mencionados, os perigos biológicos estão associados principalmente com fatores não controláveis e dependem de condições ambientais como temperatura e umidade, inclusive antes do processamento dos alimentos [053]. O crescimento dos microrganismos ocorre naturalmente durante a deterioração dos alimentos. Embora alguns deles sejam usados controladamente na fermentação de determinados alimentos para o aprimoramento de suas características organolépticas, o crescimento de eventuais microrganismos patogênicos pode ser igualmente favorecido. De fato, independentemente da qualidade dos alimentos, é normal encontrar

um determinado nível aceitável de microrganismos patogênicos nos alimentos crus [054]. Adicionalmente, o armazenamento e/ou manipulação inadequada dos alimentos contribui significativamente para a rápida multiplicação destes microrganismos, incrementando dessa maneira a periculosidade do alimento [055].

08 Como resultado do crescimento descontrolado de microrganismos patogênicos, ocorre o aumento proporcional na concentração de metabolitos secundários tóxicos para o ser humano [056]. Nesta categoria encontramos as aflatoxinas. Produzidas por fungos das espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, estas biomoléculas formam parte do maior grupo de carcinógenos alimentares exógenos conhecidos. As aflatoxinas também representam o grupo de micotoxinas com maior número de resultados positivos em alimentos já relatado [057]. No âmbito internacional, a AOAC (*Association of official analytical chemists*) recomenda que a confirmação do diagnóstico positivo para aflatoxinas seja realizada tanto por métodos qualitativos como quantitativos, baseados em cromatografia de camada fina e cromatografia líquida de alto rendimento, ou então por métodos imunológicos como o teste ELISA. Contudo, a necessidade de pessoal especializado e treinado para a correta realização dos complicados protocolos, dificultam ainda a sua utilização como alternativa rápida e de monitoramento contínuo durante o processamento ou manipulação de alimentos. Por sua parte os imunoensaios abrangem grande parte do mercado da segurança alimentar, e são implementados por disponibilizar métodos que podem ser muito bem utilizados dentro e fora dos laboratórios sem precisar de equipamentos especializados e relativamente caros. Embora os imunoensaios sejam conhecidos por sua notável especificidade, ressaltamos que no caso de testes colorimétricos como o ELISA, o limite de detecção pode ser afetado pela alta

probabilidade de obter reações cruzadas entre os cromóforos e moléculas naturalmente presentes nas amostras obtidas diretamente dos alimentos como, por exemplo, as gorduras [058].

09 Como alternativa, os biossensores têm sido propostos como uma ferramenta rápida e barata para a detecção de aflatoxinas, visando conseguir ou melhorar a sensibilidade, acurácia e especificidade dos métodos convencionais [059]. De fato, nos últimos 15 anos, o uso de diferentes técnicas de transdução para a biodeteção de micotoxinas em alimentos têm sido amplamente exploradas. Resultados promissores demonstram a diminuição de riscos durante a manipulação das amostras, sobretudo, devido a que neste processo de detecção, precisa-se de uma pequena quantidade de amostra cujo fator de diluição corresponde propriamente ao limite de detecção [060]. Consequentemente, destacamos que a utilização do immunosensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de carbono e cisteína aqui apresentado, também pode ser considerado seguro para uso por pessoal técnico não especializado para aplicações em segurança alimentar.

10 O uso de eletrodos nanoestruturados como ferramentas da química analítica vem se tornando uma tendência em diversas áreas da ciência aplicada. Reiteradamente, o melhoramento da sensibilidade, seletividade e rendimento dos sensores analíticos eletroquímicos e biossensores é atribuída ao aumento do desempenho eletroanalítico dos eletrodos nanoestruturados [061]. Conforme descrito no presente relatório, o procedimento objeto desta patente, aprimora características amplamente desejadas nos biossensores, tais como área superficial, sensibilidade, estabilidade e biocompatibilidade.

11 Dentre os biossensores eletroquímicos, os baseados no princípio impedimétrico são especialmente reconhecidos por sua alta sensibilidade. Muitas alternativas têm sido exploradas para aprimorar sua seletividade e estabilidade, com o objetivo de tentar conseguir uma resposta rápida a partir do uso mínimo de reagentes e de amostras sem prétratamento [062]. Destaca-se que o funcionamento destes dispositivos é simples. A presença e concentração do analito de interesse pode ser determinado na superfície do eletrodo a partir das mudanças da corrente elétrica resultantes da oxidação ou redução de uma solução de espécies eletroativas, na qual o biossensor deve se encontrar submerso.

12 Em eletroquímica, os eletrodos de carbono são conhecidos por seu baixo custo, boa transferência de elétrons e biocompatibilidade. Apesar disso, os nanomateriais de carbono se encontram ainda sob investigação para se conseguir o desempenho especulado com base em suas propriedades catalíticas e eletrônicas intrínsecas [063].

13 As nanoestruturas de carbono apresentam propriedades dimensionais, eletroquímicas e catalíticas bem documentadas que as tornam em candidatas ideais a serem empregadas na nanoestruturação dos biossensores [062]. Ademais, sua inocuidade ao meio ambiente e compatibilidade biológica [064] se apresentam como características adequadas para seu uso no desenvolvimento de biossensores de monitoramento contínuo *in vivo*. Desde a descoberta dos fulerenos, os materiais carbônicos estruturados à nanoescala contam com grande popularidade. Praticamente, o acúmulo de excelentes pesquisas se focam no estudo de suas propriedades eletrônicas, magnéticas e ópticas, que podem ser customizadas a partir do arranjo estrutural da rede hexagonal de carbonos unidos por ligações Sp^2 , comum a todas elas. Até a presente data, já foram descritas um grande número de nanoestruturas de carbono tais

como os nanocones, nanodiscos, toróides, schwarzitas, nanotubos de carbono, grafeno e, posteriormente, as nanofitas de grafeno. Outrossim, as propriedades mais destacadas na literatura estão relacionadas principalmente com o fato dos materiais em nanoescala apresentarem um destacado aumento da área superficial associado à diminuição de volume. Claramente, o uso de nanopartículas representa uma solução prática para o aumento da área superficial, e assim, da densidade dos sítios para modificação química.

14 A grande maioria das metodologias que empregam nanoestruturas de carbono para a modificação de eletrodos de uso eletroquímico envolvem interações físico-químicas [065]. Contudo, interações fracas e não direcionadas são insuficientes para resistir aos mais simples protocolos de preparação de biossensores. Por outro lado, quando ligações covalentes são exploradas, moléculas altamente tóxicas como os organo-silanos, são preferidas [066-068]. Por estas razões, mostraremos a seguir que o maior diferencial encontrado na presente invenção, com relação aos trabalhos publicados, tanto na literatura científica quanto na de patentes, corresponde ao uso de biomoléculas sulfuradas inócuas com o objetivo de imobilizar covalentemente nanoestruturas de carbono na superfície de eletrodos metálicos ou óxido metálicos.

15 Diversas publicações científicas demonstram certa facilidade na modificação de eletrodos de carbono vítreo ou de ouro [063, 069, 070]. Uma técnica popularizada até o momento é a de gotejamento direto. Como requisito, é necessário conseguir preparar uma solução homogênea de qualquer tipo de nanoestrutura ou compósito a ser testada como plataforma eletroquímica. Contudo, diversas contradições quanto a natureza do material e o solvente selecionado são encontradas na literatura. Ademais, soluções coloidais são igualmente empregadas [071-073]. Uma vez obtida

a solução desejada, o eletrodo a ser modificado é tratado com uma limpeza excepcional. Água régia, diversos ácidos e solventes orgânicos além de protocolos de polimento e sonicação são usualmente utilizados. A limpeza eletroquímica realizada pela ciclagem de um potencial elétrico durante a imersão do eletrodo em uma solução diluída de ácido sulfúrico é igualmente um procedimento comum. Uma vez limpo o eletrodo, a fisissorção é facilitada [074]. Inúmeros materiais tem sido assim imobilizados, contudo, sua reprodutibilidade é baixa e sua reversibilidade é praticamente impossível dado que qualquer processo de limpeza levará à desestabilização do material adsorvido [075].

16 Em se tratando de pesquisas que visam aumentar a robustez da plataforma de transdução, ligações covalentes empregam principalmente organo-silanos, quaisquer moléculas orgânicas ou inorgânicas tioladas ou as conhecidas como ligantes moleculares [076]. No entanto, seu descarte é problemático, sendo preciso armazenamento por tempo indefinido dos rejeitos, e assim mesmo, assegurados contra vazamentos. Devido ao risco latente para o meio ambiente é importante encontrar substitutos de baixa toxicidade, e se possível, com opção a tratamento de biodegradação.

17 Não é numerosa a literatura específica de patentes, identificada por sua similaridade com os termos contidos no presente trabalho. Em geral quando comparadas entre si, as patentes identificadas descrevem a modificação de substratos por meio do uso de filmes meso-porosos orgânicos ou inorgânicos, caracterizados quimicamente como revestimentos hidrofóbicos. A patente WO2009118739A1, relacionada com a construção de sensores químicos nanoestruturados para detecção de explosivos, reivindica o uso de revestimentos orgânicos criados com pequenas moléculas, monômeros, oligômeros e polímeros, contendo tióis, tiolatos, sulfuretos, disulfuretos, carbamatos, aminas, fosfinas, carboxilatos,

cianetos ou isocianetos etc. Contudo, salientamos que o método de imobilização se mantém do tipo não covalente para a maioria dos substratos listados, ademais de que, moléculas biológicas não foram empregadas para a imobilização das nanoestruturas. A patente US7745856B2, descreve um sensor que compreende o uso de nanotubos ou nanofios recobertos por uma dupla camada de lipídio em torno do mesmo. Diferentemente do método aqui apresentado, essa patente pretende imobilizar junto com a bicamada lipídica um elemento de detecção. O nanotubo recoberto pela bicamada lipídica ou sensor de nanofios, pode detectar variações no transporte de íons através de uma proteína transmembranar. A eficiência de detecção fornecida, utiliza métodos de amplificação de sinal além de permitir uma multiplexação integrada.

18 Em se tratando de literatura de patentes encontradas por similaridade de termos, podemos citar a patente US7911009B2, que se refere à preparação de nanossensores para o diagnóstico de doenças usando uma plataforma baseada em nanofibras de carbono. Compreendendo uma nano-fibra um marcador substituto, e um agente para a detecção de uma espécie química específica. Tais conjuntos de nanopartículas são ligados à plataforma sensora pela sua combinação com polímeros iônicos para a detecção plasmática de soro fetal bovino. Contudo, salientamos que o método de imobilização carece de modificação covalente, sendo obtido por interações de fisissorção. A patente WO2013033359A1 tenta estender-se a todas as possibilidades de construção de biossensores baseados em nanotubos de carbono. Salientamos que objetivo da supracitada patente foi o desenvolvimento de uma arquitetura tipo transistor. Entretanto, o método para construção da plataforma consiste no crescimento de nanotubos diretamente sobre uma placa de silício pelo método de deposição química de vapor. Embora este método permita uma interação forte entre substrato e

9\26

nanoestrutura, a mesma não é covalente, e portanto sua desestabilização

pode ocorrer. Outra diferença importante consiste em que no procedimento aqui descrito, as moléculas biológicas são expressamente empregadas para a imobilização das nanoestruturas ao substrato. A patente CN100410656 descreve um método para preparar compósitos de nanotubos de carbono com cisteína sobre eletrodos de carbono vítreo. Uma das principais reivindicações consiste em conseguir a polimerização do aminoácido Lcisteína pela sua exposição à luz ultravioleta. Os nanotubos de carbono têm de ser previamente dispersados numa solução aquosa de cisteína para posteriormente ser gotejada diretamente sobre o eletrodo, e finalmente, ao ser exposto o eletrodo à luz ultravioleta por determinado tempo de cura. Desta forma, os nanotubos ficaram presos nas cadeias poliméricas. Contudo, do mesmo modo salientamos que, neste caso, a relação compósito-carbono vítreo não pode ser considerada como covalente. As diferenças existentes entre as patentes descritas podem ser observadas através da comparação entre esses documentos na Tabela I.

Tabela I - comparação entre as componentes características de cada invento.

	PRESENTE INVENTO	WO200911 8739 A1	US77458 56B2	US79110 09B2	WO201303 3359 A1	CN100410 656
Estrutura de carbono nanométrica	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM
Imobilização covalente ao substrato	SIM	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Aminoácido sulfurado	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM
Agente de detecção específico	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
Imobilização covalente do agente específico	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
Plataforma eletroquímica	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM

10\26

19 Problemas e Limitações do Estado da Técnica

20 As limitações que podemos identificar nos procedimentos atuais são as seguintes: primeiro, a imobilização da camada transdutora sobre o substrato depende do uso de matrizes iônicas que permitam interações físico-químicas entre elas, o substrato e a nanopartículas. Não sendo imobilizada covalentemente, a estabilidade da camada transdutora se vê comprometida durante os passos de preparação consecutivos, incubação, lavagem com água abundante, processos térmicos, etc. A variabilidade da área biossensora, dificulta assim a reprodutibilidade e acurácia dos eletrodos eletroquímicos preparados por esse tipo de protocolos. Quando comparados os métodos de imobilização covalente com os que propiciam uma simples adsorção, ressaltamos que os primeiros conseguem uma maior porcentagem de reprodutibilidade entre amostras, e também, que o eletrodo possa ser regenerado ao seu estado inicial para apresentar uma outra amostra a ser testada. Destaca-se que este fenômeno é o resultado da força da ligação covalente que impede que o material ligado seja arrastado por

forças mecânicas simples, tais como um jato contínuo de água. Em segundo lugar, quando as ligações covalentes são escolhidos, os protocolos requerem o uso de moléculas com elevada toxicidade para o meio ambiente. Dessa maneira, os procedimentos aqui apresentados diminuem a necessidade de uso de reagentes de difícil manuseio. Outrossim, os procedimentos aqui apresentados se distinguem pela fácil modificação de eletrodos metálicos ou óxido metálicos com biomoléculas orgânicas, como por exemplo, os aminoácidos sulfurados.

21 Objetivos da Invenção

11\26

22 O escopo da presente invenção compreende: 1) uma metodologia para imobilização de nanoestruturas de carbono funcionalizadas com grupos carboxílicos pela ação simultânea de um tratamento ácido seguido por um tratamento de oxidação, 2) ademais, apresentamos, sem intenção de limitá-la, uma das formas de imobilização covalente em um único passo, que se desenvolve através de um método de química molhada, na presença de aminoácidos sulfurados como a cisteína, e c) propomos sua aplicação em sensores eletroquímicos baseados no princípio impedimétrico para a detecção, identificação e quantificação de biomoléculas de interesse para a segurança alimentar. Deve ser observado ainda, que no processo apresentado dispensamos o uso de moléculas não biológicas que sejam orgânicas ou inorgânicas sulfuradas. Assim mesmo, esta invenção evita e dispensa a necessidade de marcadores, uma vez que esta técnica revela o aprimoramento nas propriedades elétricas da superfície do eletrodo tais como a resistência e/ou capacitância, mesmas que têm uma resposta representativa a partir da captura da molécula alvo, sem adição de amplificadores de sinal.

23 A presente invenção tem também como objetivo o desenvolvimento de novos sistemas eletroquímicos estruturados com pelo menos um tipo de partícula de carbono de dimensionalidade nanométrica para produção em pequena, média ou grande escala, com custo operacional reduzido e, excepcionalmente, fácil manuseio dos rejeitos químicos.

24 Solução

25 A patente relacionada com o processo aqui apresentado se refere à preparação de biossensores eletroquímicos baseados em pelo menos um tipo de nanoestrutura de carbono e pelo menos um tipo de biomolécula sulfurada para seu uso em segurança alimentar,

12\26

especificamente, para a detecção de micotoxinas em amostras alimentares. Ressaltamos que este processo fornece vantagens operacionais e de disposição de rejeitos químicos com resultados na economia de tempo e custos. Como características principais apontamos a) a utilização de ligações covalentes direcionadas à imobilização das nanoestruturas de carbono sob o eletrodo, b) o incremento no controle e número de sítios de imobilização, assim como c) o aprimoramento da sensibilidade. Na hipótese atual, o aumento da sensibilidade do dispositivo aqui apresentado se encontra relacionado com a modificação dirigida e controlada dos eletrodos metálicos ou óxido metálicos. A modificação da superfície do eletrodo ocorre pela formação de um filme homogêneo, denso e compacto composto por pelo menos um tipo de biomolécula sulfurada. Estas pequenas moléculas terminam enxertadas na superfície do eletrodo seja, evido a ligações covalentes ocorrendo entre seus átomos de enxofre e os átomos de ouro da superfície do eletrodo, ou então, por meio de quaisquer métodos de ancoragem que empreguem os defeitos atômicos da rede cristalina do substrato. Posteriormente, esse filme será utilizado para prosseguir com a ancoragem covalente das nanopartículas de carbono. Por exemplo, o aminoácido cisteína possui um grupo amino que pode ser utilizado para unir os grupos carboxílicos presentes nos nanotubos de carbono.

26 Vantagens

27 Uma das vantagens mais destacadas do processo de imobilização covalente de nanoestruturas aqui descrito, está associada ao fato de dispensar o uso de moléculas orgânicas ou inorgânicas sulfuradas que apresentem toxicidade ao meio ambiente. As moléculas aqui empregadas para imobilizar as nanoestruturas de carbono podem conter pelo menos um alquiltiol, tioálcool, tioéter, tioéster, tiocetona, tiofenol e/ou

13\26

derivados destes. Estas biomoléculas não são tóxicas nem precisam de armazenagem ou descarte especial.

28 Como característica, não são utilizados monômeros ou polímeros iônicos nem quaisquer metodologias de polimerização para gerar ou empregar polímeros com a intenção de serem reticuladores que propiciem a imobilização por aprisionamento das nanopartículas de carbono. Igualmente, os procedimentos não empregam quaisquer outras moléculas ou processos que tenham a ver unicamente com a fisissorção da camada transdutora sobre o eletrodo.

29 A especificidade dos dispositivos preparados pelos processos aqui descritos, dependem da capacidade de bioreconhecimento do anticorpo imobilizado covalentemente com as nanoestruturas de carbono disponibilizados sobre o transdutor eletroquímico. As pesquisas sobre anticorpos contam com mais de 100 anos de experiência e aproximadamente 40 anos de desenvolvimento industrial. De fato, os anticorpos dominam a atuação em diagnósticos moleculares e praticamente existem versões humanizadas de qualquer um deles [077]. Contudo, destacamos que o processo aqui apresentado é relativamente simples, porque os anticorpos empregados não precisam ser modificados para administração humana. De acordo com o fabricante, quando empregado em ELISA, o anticorpo anti-aflatoxina B1 produzido em coelho é capaz de detectar diluições próximas a 1:1000. Contudo, destacamos que a imobilização de anticorpos tem demonstrado contribuir com a diminuição nesses limites de detecção [078]. A sensibilidade dos imunossensores varia dependendo do transdutor e dos métodos de imobilização empregados [079], diante disso, salientamos que o procedimento aqui apresentado exibe respostas satisfatórias na análise de amostras de farinha de milho.

14\26

contaminadas com aflatoxina B1 em concentrações na faixa de picograma por mL.

30 O presente dispositivo aumenta a segurança durante a manipulação de amostras tóxicas. Para realizar a detecção da aflatoxina, o immunosensor aqui apresentado necessita unicamente de 2 microlitros de amostra alimentar com uma faixa de concentração de 0.1 picograma por mililitro até 1 nanograma por mililitro. O presente dispositivo pode ser utilizado em laboratórios de análises clínicas, de ensino ou pesquisa. Da mesma maneira nada impede a adaptação de um potenciostato portátil para sua aplicação no campo, permitindo assim, o monitoramento contínuo de alimentos líquidos como sucos de frutas, verduras, grãos de cereais, derivados lácteos ou suas versões sólidas.

31 A novidade e o efeito técnico alcançado

32 A novidade da presente invenção tem a ver com a metodologia empregada na preparação de dispositivos utilizados para diagnosticar a presença de moléculas de interesse para a segurança alimentar. Biomoléculas sulfuradas foram empregadas para conseguir a imobilização covalente de pelo menos uma nanoestrutura de carbono carboxilada. Até o presente momento este tipo específico de imobilização não havia sido identificado nem reclamado por nenhuma outra instituição de pesquisa ou ensino ou mesmo descrito na literatura.

33 Descrição Detalhada

34 Sem a intenção de limitar o escopo de nossa invenção, os exemplos a seguir são fornecidos somente como maneira de ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a preparação dos biossensores, em alinhamento com os quais a presente invenção se refere.

15\26

35 Fica compreendido como “ácido diluído” o grupo que inclui reagentes químicos como H_3PO_4 , H_2SO_4 , HCl , HNO_3 , ou qualquer outro que apresente característica de ácido e que se encontre diluído em concentrações abaixo de 5 molar [080].

36 Fica compreendido como biomolécula sulfurada qualquer molécula que apresente pelo menos um dos seguintes grupos: aquiltiol, tioálcool, tioéter, tioéster, tiocetona, tiofenol, ou misturas das mesmas e que sejam produzidas, isoladas, extraídas ou preparadas a partir de partes ou do total de células animais, vegetais, bacterianas, ou então microrganismos em geral.

037 Ficam compreendidos como nanoestruturas de carbono os nanocones, nanodiscos, toróides, schwarzitas, nanotubos de carbono, grafeno, nanofitas de grafeno ou qualquer arranjo estrutural da rede hexagonal conformada por átomos de carbono ligados por hibridização do tipo sp^2 que culmine na criação de uma partícula finita à escala nanométrica.

38 Sem a intenção de limitar o presente processo, a ativação dos grupos funcionais presentes nas nanoestruturas de carbono pode ser realizada com derivados de carbodiimidas, azidas, cloretos de acila, carbóxi anidridos, ésteres de cianometilo, hidroxisuccinimida, hidroxiftalimida, nitroindolinas ou tio-tiazolidinas.

39 Ficam compreendidos como agentes de especificidade as imunoglobulinas, aptâmeros, proteínas ligantes a hidratos de carbono ou quaisquer outras biomoléculas que, natural ou artificialmente, sejam criadas ou selecionadas para reconhecer moléculas tóxicas de interesse para a segurança alimentar.

16\26

40 Ficam compreendidos como agentes bloqueadores inespecíficos a albumina de soro bovino, caseína, glicina, pepsina, surfactantes não iônicos, polietileno glicol, gelatina de peixe e derivados de soro, já como agentes bloqueadores específicos se encontram quaisquer nanopartículas direcionadas para o fim de minimizar ou eliminar interações específicas. Em geral, o objetivo é o de bloquear qualquer ligação indesejada entre o eletrodo final modificado e as moléculas presentes nas amostras suspeitas por não serem complementares ou afins aos agentes de especificidade. Pelo próprio objetivo destes agentes bloqueadores, a maioria das vezes os mesmos terminam unidos ao eletrodo por meio de interações físico-químicas como a fisissorção dirigida por sítios hidrofóbicos e inespecíficos.

41 De forma geral, o processo aqui apresentado consegue construir o biodispositivo final, através da imobilização covalente da nanoestrutura de carbono. De forma geral, o procedimento para conseguir a montagem da plataforma requer que em cada incubação realizada neste processo seja mantida uma atmosfera úmida controlada em pelo menos 80%. Assim, um eletrodo metálico ou de óxido metálico é inicialmente polido durante 3 minutos com um papel feltro e pó de alumina de 50 nm. Seguidamente, o eletrodo é enxaguado e colocado em um banho ultrassônico moderado (entre 20 e 200 KHz) com água deionizada por um período não inferior a cinco minutos e posteriormente seco a 25 C. Posteriormente, uma solução aquosa de cisteína é gotejada sobre o eletrodo que deve ser incubado por um período não inferior a cinco minutos. Uma vez concluída esta etapa, o eletrodo é lavado com abundante água deionizada e colocado no banho ultrassônico mencionado por um período não inferior a 30 segundos. Subsequentemente, uma solução de nanoestruturas de carbono com grupos funcionais ativados propriamente

17\26

para se unir covalentemente ao aminoácido sulfurado é gotejada sobre o eletrodo que será então incubado por um período não inferior a cinco minutos. Após a incubação, o eletrodo é lavado minuciosamente com água deionizada abundante. Finalmente, o eletrodo deve ser imediatamente modificado com o anticorpo anti-AFB1. Esta última ancoragem ocorre sobre o eletrodo modificado com nanoestruturas de carbono gotejando a solução do anticorpo com grupos funcionais ativados adequadamente para este fim. Após a incubação, o eletrodo é lavado com abundante água deionizada e colocado no banho ultrassônico por um período não inferior a 30 segundos. Como etapa final, os sítios livres para interações inespecíficas no eletrodo modificado devem ser bloqueados. Para isso, uma solução de agente bloqueador deve ser gotejada e mantida em incubação por pelo menos 5 min. Passado este tempo, o eletrodo deve ser lavado e armazenado

de acordo ao agente bloqueador empregado nesta última etapa. Após esta etapa final o imunossensor se encontra pronto para ser utilizado. Ele mantém a capacidade transdutora das nanoestruturas de carbono e a capacidade de bioreconhecimento do anticorpo contra a AFB1.

42 Preparação e caracterização dos biossensores

043 Preparação dos biossensores

44 Sem intenção de limitar os procedimentos e com o único objetivo de exemplificar uma das muitas metodologias cobertas por esta patente, na Fig. 1, mostramos o processo de montagem de um biossensor eletroquímico baseado em nanotubos de carbono e cisteína para seu uso como imunossensor impedimétrico de aflatoxina B1. Inicialmente, 3 microlitros de uma solução 15 mM de cisteína (Cys) é gotejada sobre a superfície do eletrodo permitindo 20 minutos de incubação (Fig. 1a). Após este tempo, o eletrodo é lavado com água deionizada e colocado em banho

18\26

ultrassônico por 1 min. Posteriormente (Fig. 1b), 3 microlitros de uma solução aquosa contendo nanotubos de carbono carboxilados diluídos em uma solução 1:1 de 0.4 M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 0.1 M de N- hidroxisuccinimida (NHS) são gotejados sobre a camada de cisteína. O eletrodo é incubado por 50 min para se obter o sistema Cys-EDC:NHS-NTC. Subsequentemente (Fig. 1c), 3 microlitros de uma solução de anticorpo anti-aflatoxina B1 previamente ativada com o conjugado 1:1 de 0.4 M EDC e 0.1 M NHS é gotejada e incubada por 40 minutos. Finalmente (Fig. 1d), os sítios livres para interações inespecíficas presentes no eletrodo são bloqueados gotejando 3 microlitros de uma solução de BSA e incubando o eletrodo por 20 min. Após a incubação o eletrodo se encontra finalizado e pronto para ser usado.

45 Com o objetivo de determinar o intervalo de detecção linear do biossensor aqui apresentado, diversas amostras com concentrações de aflatoxina B1 (AFB1) variando de 0.1 picograma/mililitro até 13 picogramas/mililitro e testados em triplicata (Fig. 1e).

46 Caracterização do biossensor

47 Na Fig. 2 apresentamos os espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR, Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy) obtidos da superfície do substrato de ouro nas diferentes etapas de modificação. Inicialmente, logo após do tratamento com cisteína, percebemos que a ausência de bandas ao redor de 2600 cm⁻¹ indica a correta imobilização do grupo sulfidril sobre o eletrodo de ouro. No mesmo espectro, as bandas presentes em 1329cm⁻¹ e 1413 cm⁻¹ indicam a presença do grupo amino que será empregado para imobilização dos nanotubos de carbono [081-083]. Após a imobilização das nanoestruturas podemos perceber a banda larga

entre 3100 cm⁻¹ e 3600 cm⁻¹, região característica ao estiramentos dos grupos O-H ácidos [084], a banda em 1634 cm⁻¹ correspondente ao modo fônon ativo da banda G dos materiais grafíticos, já as bandas em 1350 cm⁻¹, 1060 cm⁻¹, 902 cm⁻¹ e 782 cm⁻¹ correspondem aos modos de estiramento dos grupos carboxílicos [085]. Após a imobilização dos AcAFB1, fica evidente o desaparecimento das bandas anteriormente presentes em 782 cm⁻¹ e 900 cm⁻¹, sendo este o resultado da ocupação dos grupos carboxílicos dos nanotubos de carbono. Da mesma maneira vemos uma redução drástica da larga banda que ocorria na etapa anterior entre 3100- 3600 cm⁻¹ correspondente aos grupos O-H ácidos.

48 A evolução topográfica do eletrodo foi analisada ao final de cada etapa de modificação. As imagens da superfície do eletrodo modificado foram obtidas utilizando microscopia de força atômica. Na Fig. 3 apresentamos o processo de montagem do sistema sensor Cys- EDC:NHS-NTC-EDC:NHS-AcAFB1. Na Fig. 3a observamos a topografia inicial da superfície do eletrodo. Nesse momento o eletrodo se encontra limpo. Após a modificação com a cisteína (Fig. 3b) podemos observar uma mudança na morfologia. Pela imagem podemos identificar a imobilização de um filme denso e homogêneo do aminoácido de 37 nm de altura, assim mesmo, podemos relatar que a preparação recente de cisteína e o processo de incubação propiciaram uma forte adesão covalente entre o grupo sulfidril presente no aminoácido e a superfície do eletrodo. Na Fig. 3c, apresentamos a morfologia da superfície após a ancoragem covalente dos nanotubos de carbono. Relatamos que, após uma minuciosa lavagem, pode ser observada uma drástica mudança na topologia do substrato, já que a altura do filme alcança 200 nm. Após a seguinte etapa, na Fig. 3d, apresentamos a morfologia da superfície do eletrodo após a imobilização covalente do AcAFB1. Notamos que a topologia aparece um tanto mais

20\26

homogênea e também um aumento na altura da camada transdutora para 300 nm. Finalmente, após o bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA (Fig. 3e), relatamos o aumento na altura média para 420 nm e também, a presença de uma morfologia mais homogênea e suave, sendo este, o resultado da interação inespecífica entre sítios livres ainda presentes na superfície do eletrodo e as moléculas do BSA. Como resultado deste bloqueio, agora a especificidade do biossensor se encontra aprimorada e o dispositivo se encontra pronto para realizar as detecções de AFB1. Na Fig. 3f podemos observar que o bioreconhecimento da AFB1 pelo anticorpo Anti-AFB1 ocasiona ainda uma pequena mudança na altura para 430 nm.

49 Nas Fig. 4a e 4b mostramos os resultados da espectroscopia de impedância eletroquímica na forma de um gráfico de Nyquist. Neles é plotada a relação entre a impedância real Z' no eixo das abcissas contra a impedância imaginária Z'' no eixo das ordenadas. As respostas obtidas para cada amostra foram analisadas ajustando seu comportamento a um circuito equivalente modificado de tipo Randles mostrado na Fig. 4c. Com ele, é possível avaliar a variação da resposta impedimétrica resultante das interações antígeno-anticorpo. Em termos dos componentes do circuito temos que o R_s se refere à resistência da solução eletrolítica, W é a impedância de Warburg resultante da difusão dos íons desde a solução eletrolítica em direção à interface do eletrodo, CPE é o elemento de fase constante que se refere à somatória de capacitâncias do sistema, no qual N é a constante de transferência de elétrons da sonda redox que provém das camadas de biomoléculas adsorvidas à superfície, e finalmente, R_{ct} é a resistência à transferência de carga gerada pelo impedimento à movimentação do par redox. Na Tabela 1 são apresentados os resultados dessa análise tanto para as amostras de AFB1 pura utilizada para a curva de calibração, como para as amostras de farinha de milho contaminada.

21\26

Inicialmente podemos observar que o biossensor modificado Au_Cys_NTC_AcAFB1 apresenta um valor R_{ct} 4030 Ω . A partir da detecção da primeira amostra podemos ver um aumento gradual da resistência desde 6970 Ω para 0.1 pg/mL, 9030 Ω para 1.0 pg/mL, 20200 Ω para 3.0 pg/mL, 30100 Ω para 6.0 pg/mL, 38400 Ω para 9 pg/mL até 48300 Ω para 11 pg/mL. Seguindo a mesma tendência, as respostas associadas às amostras de farinha de milho contaminada com AFB1 começam desde 8380 Ω para 0.1 pg/mL, 30300 Ω para 5.0 pg/mL, 38800 Ω para 9.0 pg/mL, 47200 Ω 11.0 pg/mL e 61300 Ω para 15.0 pg/mL.

50 O bioreconhecimento da AFB1 permite a formação de camadas isolantes sobre o eletrodo modificado com AcAFB1. Dessa maneira, a concentração de AFB1 presente nas amostras permite a variação gradual de R_{ct} . A variação relativa de R_{ct} ($\% \Delta R_{ct}$) é útil para avaliar o desempenho do immunosensor e calculado de acordo a seguinte equação:

$$\% \Delta R_{ct} = \left| \frac{R_{ct}(\text{Au_Cys_NTC_AcAFB1_AFB1}) - R_{ct}(\text{Au_Cys_NTC_AcAFB1})}{R_{ct}(\text{Au_Cys_NTC_AcAFB1})} \right| \times 100.$$

Aqui, o valor de R_{ct} correspondente ao eletrodo modificado com AcAFB1 (Au_Cys_NTC_AcAFB1) é comparado com a resposta do biossensor após sua interação com a AFB1 (Au_Cys_NTC_AcAFB1_AFB1). Os valores $\% \Delta R_{ct}$ são mostrados na Tabela 2 com o resultado do cálculo do erro corresponde ao desvio dos resultados obtidos por triplicata em cada ponto.

	R_s (Ω)	CPE (μMho)	N	R_{CT} (Ω)	W (μMho)
Au_Cys_NTC_AcAFB1	651	3.68	0.827	4030	396
AFB1_(0.1 pg/mL)	703	2.89	0.854	6970	402
AFB1_(1.0 pg/mL)	666	2.38	0.866	9030	424

22\26

AFB1_(3.0 pg/mL)	670	2.50	0.876	20200	485
AFB1_(6.0 pg/mL)	644	2.37	0.874	30100	621
AFB1_(9.0 pg/mL)	722	2.31	0.878	38400	848
AFB1_(11.0 pg/mL)	649	2.29	0.874	48300	1540
Farinha_(0.1 pg/mL)	642	2.44	0.871	8380	419
Farinha_(5.0 pg/mL)	773	2.11	0.833	30300	660
Farinha_(9.0 pg/mL)	742	2.01	0.892	38800	709
Farinha_(11.0 pg/mL)	706	2.01	0.887	47200	1310
Farinha_(15.0 pg/mL)	776	1.94	0.888	61300	4640

51 Na Fig. 5 são apresentados os valores de % Δ Rct em função das concentrações conhecidas da toxina. A relação encontrada entre elas é linear (círculos pretos) e pode ser modelada pela equação $Rct\% = 70.44 + 92.15(AFB1 \text{ pg/mL})$ com um coeficiente de correlação de 0.99. Neste mesmo gráfico, em círculos menores vermelhos, são apresentados os valores de % Δ Rct obtidos a partir das amostras de farinha de milho contaminada. Desta forma, foi comprovado que as respostas obtidas apresentam uma tendência linear da curva padrão.

Tabela 2.

	%ΔRct	Desvio padrão$\pm$
AFB1_(0.1 pg/mL)	72.95	0.254
AFB1_(1.0 pg/mL)	124.07	0.187
AFB1_(3.0 pg/mL)	401.24	0.078
AFB1_(6.0 pg/mL)	646.89	0.174
AFB1_(9.0 pg/mL)	852.85	0.220
AFB1_(11.0 pg/mL)	1098.51	0.181
Farinha_(0.1 pg/mL)	107.9	0.244
Farinha_(5.0 pg/mL)	651.9	0.211
Farinha_(9.0 pg/mL)	862.8	0.201

23\26

Farinha_(11.0 pg/mL)	107.2	0.201
Farinha_(15.0 pg/mL)	1421.1	0.194

52 Referências

- 53 da Cunha, D.T., V.V. de Rosso, and E. Stedefeldt, *Should Weights and Risk Categories Be Used for Inspection Scores To Evaluate Food Safety in Restaurants?* Journal of Food Protection, 2016. 79(3): p. 501-506.
- 54 Bokulich, N.A., et al., *A new perspective on microbial landscapes within food production.* Current Opinion in Biotechnology, 2016. 37: p. 182-189.
- 55 Abdel-Aziz, S.M., et al., *Microbial Food Spoilage: Control Strategies for Shelf Life Extension*, in *Microbes in Food and Health*, N. Garg, M.S. Abdel-Aziz, and A. Aeron, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 239-264.
- 56 Martinovi, T., et al., *Foodborne pathogens and their toxins.* Journal of Proteomics.
- 57 Shephard, G.S., *Current Status of Mycotoxin Analysis: A Critical Review.* Journal of AOAC International, 2016.
- 58 Schwartzbord, J., L. Severe, and D. Brown, *Detection of trace aflatoxin M1 in human urine using a commercial ELISA followed by HPLC.* Biomarkers, 2016: p. 1-4.
- 59 Reverté, L., B. Prieto-Simón, and M. Campàs, *New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review.* Analytica Chimica Acta, 2016. 908: p. 8-21.

- 60** Mejrri Omrani, N., et al., *Electrochemical Biosensors for Food Security: Mycotoxins Detection*, in *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications*, P.D. Nikolelis and G.-P. Nikoleli, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 469-490.
- 61** Zhu, C., et al., *Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures*. Analytical Chemistry, 2015. 87(1): p. 230-249.
- 62** Rotariu, L., et al., *Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. 79: p. 80-87.
- 63** Ramnani, P., N.M. Saucedo, and A. Mulchandani, *Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors for label-free sensing of environmental pollutants*. Chemosphere, 2016. 143: p. 85- 98.
- 64** Baptista, F.R., et al., *Recent developments in carbon nanomaterial sensors*. Chemical Society Reviews, 2015. 44(13): p. 4433-4453.
- 65** Tîlmaciu, C.-M. and M.C. Morris, *Carbon nanotube biosensors*. Frontiers in Chemistry, 2015. 3: p. 59.
- 66** Jacobs, C.B., M.J. Peairs, and B.J. Venton, *Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules*. Analytica Chimica Acta, 2010. 662(2): p. 105-127.
- 67** Conway, G.E., et al., *Layer-by-layer design and optimization of xerogel-based amperometric first generation biosensors for uric acid*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2016. 775: p. 135-145.
- 68** Deng, Y., et al., *Uniform DNA Biosensors Based on Threshold Voltage of Carbon Nanotube Thin-Film Transistors*. Nano, 2016. 11(05): p. 1650060.
- 69** Eguílaz, M., et al., *Carbon nanotubes non-covalently functionalized with cytochrome c: A new bioanalytical platform for building*

bienzymatic biosensors. Microchemical Journal, 2016. 128: p. 161- 165.

70 Benvidi, A., et al., *Comparison of impedimetric detection of DNA hybridization on the various biosensors based on modified glassy carbon electrodes with PANHS and nanomaterials of RGO and MWCNTs*. Talanta, 2016. 147: p. 621-627.

71 Wang, X., et al., *Rational Design of Bioelectrochemically Multifunctional Film with Oxidase, Ferrocene, and Graphene Oxide for Development of In Vivo Electrochemical Biosensors*. Analytical chemistry, 2016.

72 Fang, L., et al., *Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on Au nanoparticles-functionalized 3D hierarchically ZnO nanostructures and its application to bioelectrochemical glucose sensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016. 222: p. 1096-1102.

73 Vatsyayan, P., *Recent Advances in the Study of Electrochemistry of Redox Proteins*. 2016.

74 Sang, S., et al., *Progress of new label-free techniques for biosensors: a review*. Critical reviews in biotechnology, 2016. 36(3): p. 465-481.

75 Templier, V., et al., *Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. 79: p. 71-79.

76 Bagheri, H., H. Piri-Moghadam, and M. Naderi, *Towards greater mechanical, thermal and chemical stability in solid-phase microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2012. 34: p. 126-139.

77 Bruno, J., *Predicting the Uncertain Future of Aptamer-Based Diagnostics and Therapeutics*. Molecules, 2015. 20(4): p. 6866.

78 Kokkinos, C., A. Economou, and M.I. Prodromidis, *Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and*

26\26

transduction strategies. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. 79: p. 88-105.

79 Wang, X., et al., *Nanoparticle-based immunosensors and immunoassays for aflatoxins*. Analytica Chimica Acta, 2016. 912: p. 10-23.

80 Mathew, A.K., et al., *An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production*. Bioresource Technology, 2016. 199: p. 13-20.

81 Chandrasekhar, S., et al., *L-Proline catalysed asymmetric aldol reactions in PEG-400 as recyclable medium and transfer aldol reactions*. Tetrahedron, 2006. 62(2): p. 338-345.

082 Pawlukoj , A., et al., *L-cysteine: neutron spectroscopy, Raman, IR and ab initio study*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2005. 61(11): p. 2474-2481.

83 Mudunkotuwa, I.A., A. Al Minshid, and V.H. Grassian, *ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid–solid interface in environmentally and biologically relevant media*. Analyst, 2014. 139(5): p. 870-881.

84 Peng, H., et al., *Sidewall Carboxylic Acid Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes*. Journal of the American Chemical Society, 2003. 125(49): p. 15174-15182.

085 Wu, T.-M., Y.-W. Lin, and C.-S. Liao, *Preparation and characterization of polyaniline/multi-walled carbon nanotube composites*. Carbon, 2005. 43(4): p. 734-740.

REIVINDICAÇÕES

1. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO IMOBILIZADAS EM CAMADAS AUTOMONTADAS PARA SEU USO EM SEGURANÇA ALIMENTAR um biossensor constituído das seguintes partes: a) uma molécula de reconhecimento (Anticorpo Monoclonal de Aflatoxina B1), b) uma superfície onde será feita a imobilização das moléculas, c) uma fonte de corrente elétrica, d) Nanotubo de Carbono (NTC) funcionalizado com Cisteína (Cys).

2. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 1 caracterizadas por serem obtidas a partir de um processo de automontagem dos analitos na superfície de ouro do sensor.

3. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por referenciar a métodos e composições para identificação de toxinas a invenção baseia-se na aplicação de uma plataforma sensora com AcAFB1 em nanotubo de carbono ligado a cisteína para detecção da toxina em amostras com baixas concentrações. Em particular foi desenvolvido um Imunosensor para a identificação da AFB1 em amostras de alimentos contaminados como a farinha de milho.

2/5

4. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 1, caracterizada pelo fato da referida superfície ser de ouro, o que proporciona uma maior condutibilidade elétrica e biocompatibilidade ao dispositivo facilitando assim a interações molecular.

5. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, conforme reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que o referido compósito é indispensável para aumentar a eficiência do dispositivo além de apresentar uma alta reatividade química.

6. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por cada etapa de montagem do nanocompósito pela junção de cisteína na superfície do sensor, ativado com EDC/NHS e seguida por NTC previamente diluído em água deionizada e depositado na superfície do sensor seguida de lavagem simples com água deionizada.

7. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado pela modificação camada a camada da superfície do biodispositivo seguida da análise impedimétrica e voltamétrica ao término de cada etapa de modificação A lavagem foi executada com água deionizada após cada período de incubação.

3/5

8. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO caracterizado por está de acordo com a reivindicação 7, em que os métodos de detecção espectroscópica foram por meio de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Voltametria Cíclica.

9. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a cisteína ser uma molécula bioativa com seu grupamento R-SH facilmente oxidável facilitando sua ligação ao nanotubo de carbono.

10. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO ,conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o conjugado 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-Hidroxisuccinimida (NHS) devido a suas propriedades, viabiliza a ligação do nanotubo de carbono a cisteína.

11. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido nanotubo por apresentar propriedades eletrônicas e sua estrutura química superficial que afeta a cinética do eletrodo,sendo portanto importantes ferramentas na construção de biossensores.

4/5

12. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal imobilizado na superfície do nanotubo de carbono é caracterizado por facilitar a troca de elétrons entre o centro redox do anticorpo e a superfície do eletrodo, permitindo que a atividade eletrocatalítica seja monitorada sem a utilização de marcadores proporcionando ao referido biossensor uma alta especificidade da resposta.

13. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO conforme reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a referida análise é feita em uma faixa de frequência de 100 MHz e 100 kHz e numa faixa de potencial de -0.2V e 0.7 V, respectivamente.

14. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por abranger ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações moleculares, para a elaboração de ferramentas para uso diagnóstico.

15. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por abranger ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações, para o desenvolvimento de biodispositivos eletroquímicos.

5/5

16. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado pelo fato de que o referido dispositivo é um imunossensor eletroquímico, conforme reivindicação 15.

17. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO, caracterizado por abranger ao menos um agente imobilizador, no mínimo um agente ativador das ligações caracterizado por ter caráter conjugado, para a elaboração de ensaios eletroquímicos para rápida e específica detecção amostras de alimentos contaminados.

18. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO caracterizado por está presente na área médica, biológica e farmacológica.

19. DISPOSITIVO IMUNOELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOESTRUTURAS DE CARBONO caracterizado por conter no mínimo monômero funcionalizado com oligonucleotídeo para elaboração de biossensores e biodispositivos.

1/3

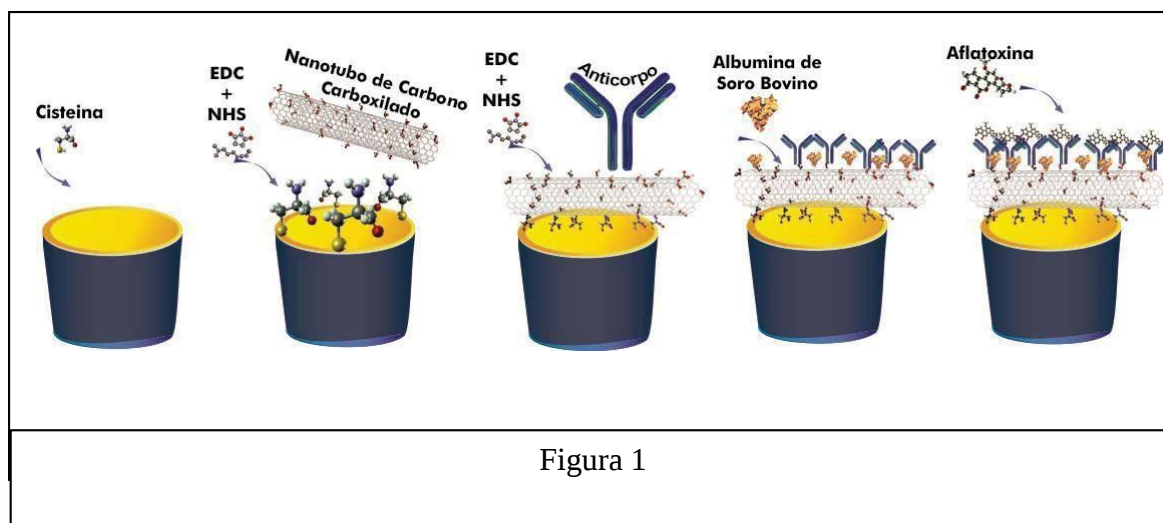


Figura 1

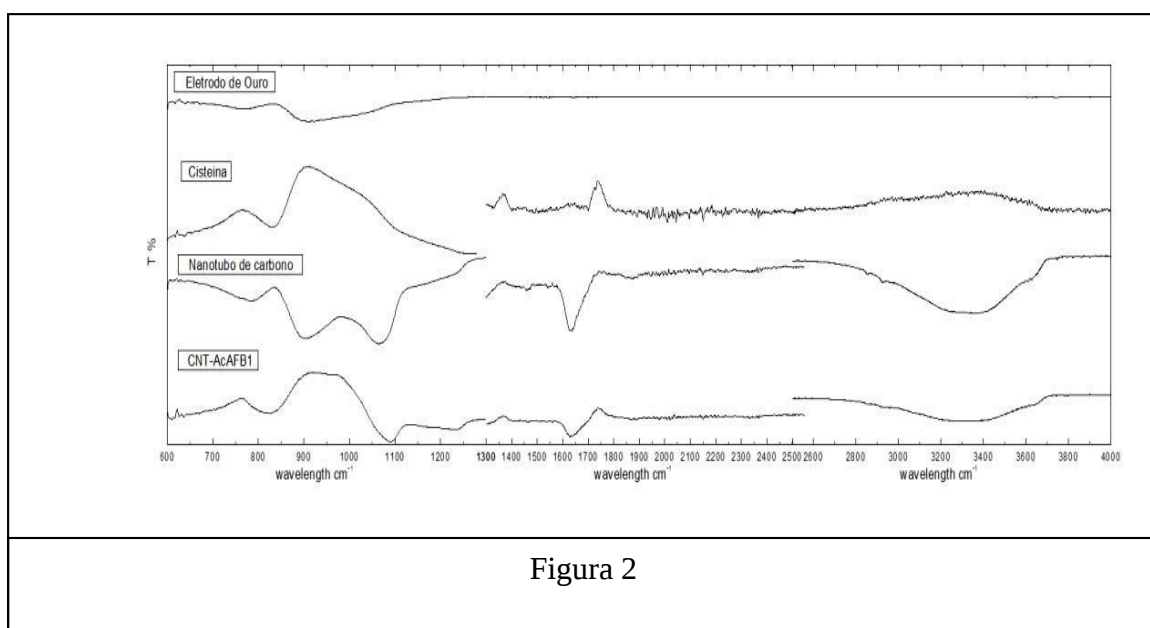


Figura 2

2/3

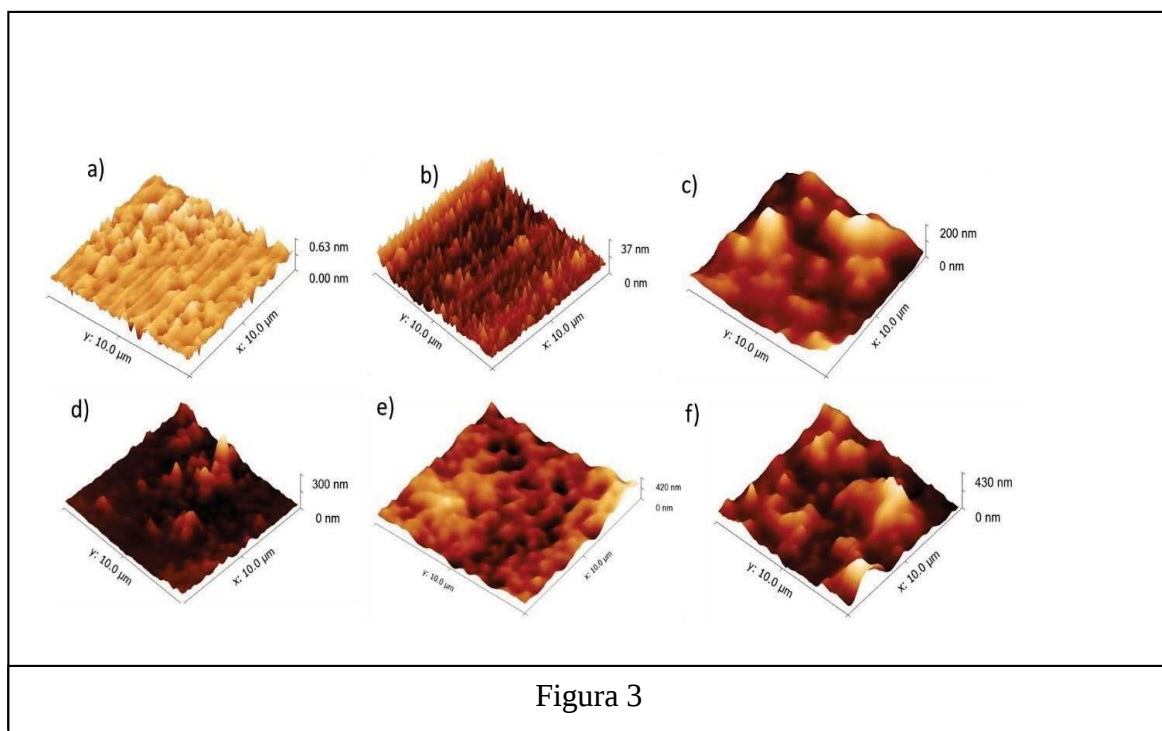


Figura 3

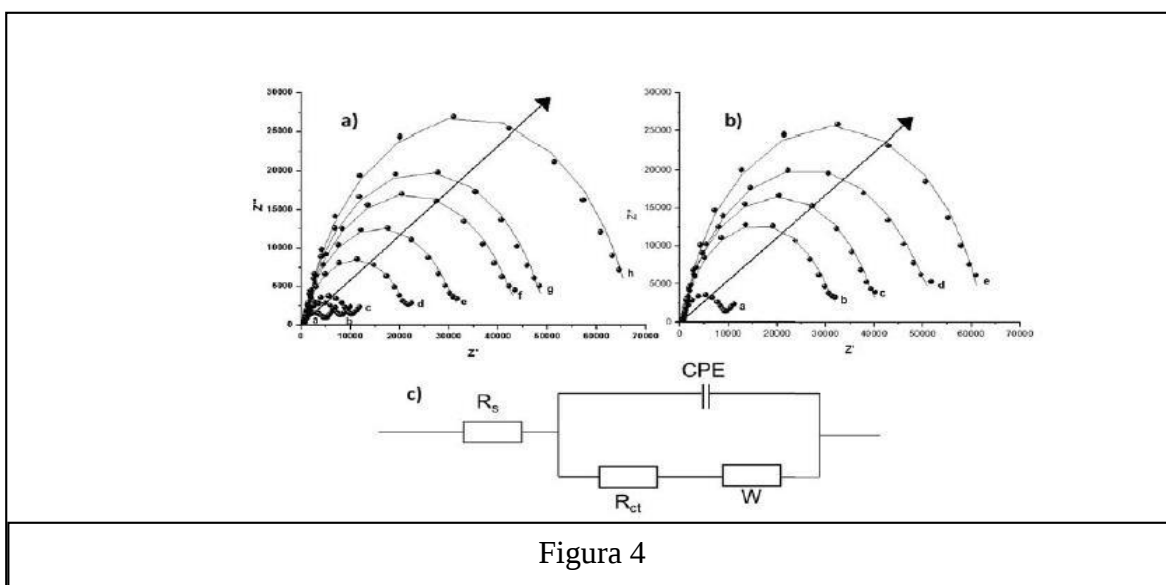


Figura 4

3/3

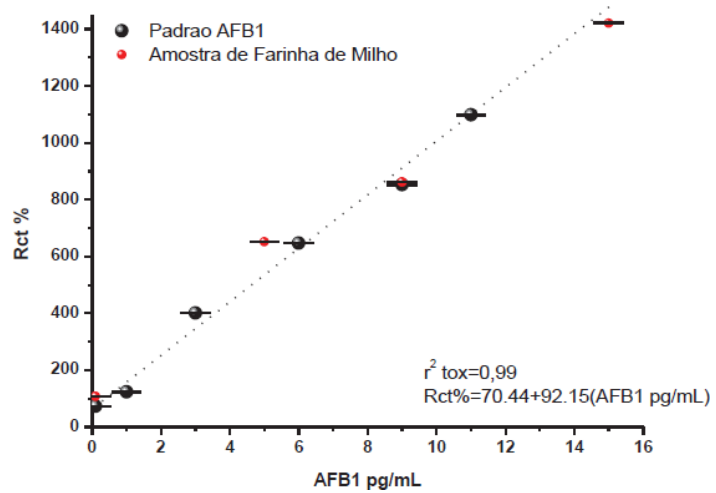


Figura 5