



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

BRENDA MARQUES DE CERQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM NANODISPOSITIVO  
IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1  
EM ALIMENTOS**

Recife  
2022

BRENDA MARQUES DE CERQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM NANODISPOSITIVO  
IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1  
EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientador: Profa. Maria Danielly de Lima  
Oliveira

Co-orientador: Prof. César Augusto Souza  
de Andrade

Recife  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Cerqueira, Brenda Marques de .

Desenvolvimento de um Nanodispositivo Imunossensor para Detecção de  
Aflatoxina B1 em Alimentos / Brenda Marques de Cerqueira. - Recife, 22.  
57 : il., tab.

Orientador(a): Maria Danielly de Lima Oliveira

Coorientador(a): Cesar Augusto Souza de Andrade

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 22.

1. Anticorpo. 2. Micotoxinas. 3. Biodispositivo. 4. AFM. 5.  
Eletroquímico. I. Oliveira, Maria Danielly de Lima. (Orientação). II. Andrade,  
Cesar Augusto Souza de. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

BRENDA MARQUES DE CERQUEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM NANODISPOSITIVO  
IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1  
EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Graduação em Biomedicina da  
Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Profa. Maria Danielly de Lima Oliveira  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

---

MSc. Léony Soares de Oliveira  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

---

MSc. Raiza Pereira Santos de Lucena  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

Dedico este trabalho a minha mãe e irmã que me apoiaram desde o começo dessa jornada. Dedico também a minha família e amigos que me ajudaram nessa caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a DEUS, a minha orientadora Prof. Maria Danielly que me recebeu e me ensinou muitas coisas no decorrer do desenvolvimento desta monografia e projetos de iniciação científica. Também agradeço ao professor César que com seu jeito descontraído ensina muito a todos do laboratório. Aos meus colegas de trabalho do grupo BIONANO que sempre estão lá para dar dicas e auxiliar nos experimentos. Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram para que esta pesquisa fosse desenvolvida, os técnicos e colaboradores do departamento de bioquímica. Ademais, a agência de fomento FACEPE pelo apoio para o avanço desta pesquisa. Agradeço também, a minha família e amigos por me apoiarem e aconselharem durante esta caminhada.

“A imaginação é mais importante que a ciência,  
porque a ciência é limitada, ao passo que a  
imaginação abrange o mundo inteiro”.

**Albert Einstein**

CERQUEIRA, Brenda Marques. **Desenvolvimento de um nanodispositivo imunossensor para detecção de aflatoxina B1 em alimentos**. 2022. 57. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Biomedicina – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

## RESUMO

As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos toxigênicos responsáveis pela contaminação de produtos alimentares, desenvolvimento de doenças ou a morte em seres humanos e animais. Estas toxinas são classificadas como micotoxinas, sendo subdividida em 4 grupos (B1, B2, G1 e G2), no qual a AFB1 é a mais potencialmente carcinogênica do grupo, segundo a agência internacional de pesquisa sobre o câncer (IARC). Logo, o controle dos níveis de AFB1 é necessário para garantir a segurança alimentar. As técnicas existentes são baseadas em cromatografia líquida de alta eficiência ou ELISA. Elas são ferramentas com uma boa sensibilidade, contudo a indústria alimentícia necessita de metodologias mais simples, rápidas e de baixo custo. Logo, para sanar este obstáculo, há o desenvolvimento de biossensores. Destacam-se os imunossensores que utilizam anticorpos ou antígenos acoplados a um transdutor físico-químico, os quais são capazes de gerar um sinal mensurável, para o reconhecimento do analito alvo. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biodispositivo capaz de mensurar a AFB1 em amostras alimentares. Para isso, foram empregadas para análise da interação biomolecular e topográfica, as técnicas eletroquímicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), voltametria cíclica (VC) e microscopia de força atômica (AFM), capazes de caracterizar cada camada de bioreconhecimento adsorvida no eletrodo. Através dos estudos foi observado a eficiente imobilização do anticorpo (Anti-AFB1), nanopartícula (NpsZnO), cisteína (Cys) e soro albumina bovina (BSA) na superfície do eletrodo de ouro, por meio de variações da taxa de transferência de elétrons. Através das variações de respostas para as técnicas de VC e EIE, após a adsorção das camadas. Como também através do AFM o aumento da rugosidade da superfície do biossensor a cada camada adsorvida. Em adição, o imunossensor fabricado (Cys-NpsZnO-Anti-AFB1-BSA) foi capaz de detectar AFB1 em diferentes concentrações, seja a toxina pura ou uma amostra alimentar contaminada. Desta maneira foi possível demonstrar a bioatividade do anticorpo após imobilização e apresentou um limite de detecção (LOD)  $0,95 \text{ pg.mL}^{-1}$ . Como também, a plataforma exibiu boa reprodutibilidade, alta seletividade e especificidade quando submetida a outra micotoxina, a Ocratoxina A (OCRA).

**Palavras-chave:** Anticorpo. Micotoxinoses. Biodispositivo. AFM. Eletroquímico.

CERQUEIRA, Brenda Marques. **Development of an immunosensor nanodevice for**

## **ABSTRACT**

Aflatoxins are secondary metabolites, produced by toxigenic fungi responsible for the contamination of food products, disease development or death in humans and animals. These toxins are classified as mycotoxins, being subdivided into 4 groups (B1, B2, G1 and G2), in which AFB1 is the most potentially carcinogenic of the group, according to the International Agency for Research on Cancer (IARC). Therefore, control of AFB1 levels is necessary to ensure food safety. Existing techniques are based on high performance liquid chromatography or ELISA. They are tools with good sensitivity, however the food industry needs simpler, faster and lower cost methodologies. Therefore, to remedy this obstacle, there is the development of biosensors. Of note are immunosensors that use antibodies or antigens coupled to a physical-chemical transducer, which are capable of generating a measurable signal for the recognition of the target analyte. This work aimed to develop a biodevice capable of measuring AFB1 in food samples. For this, the electrochemical techniques of electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (VC) and atomic force microscopy (AFM) were used to analyze the biomolecular and topographic interaction, capable of characterizing each layer of biorecognition adsorbed on the electrode. Through the studies, the efficient immobilization of the antibody (Anti-AFB1), nanoparticle (NpsZnO), cysteine (Cys) and bovine serum albumin (BSA) on the surface of the gold electrode was observed, through variations in the electron transfer rate. Through the variations of responses for the techniques of VC and EIE, after the adsorption of the layers. As well as through the AFM the increase in the surface roughness of the biosensor with each adsorbed layer. In addition, the manufactured immunosensor (Cys-NpsZnO-Anti-AFB1-BSA) was able to detect AFB1 in different concentrations, either the pure toxin or a contaminated food sample. In this way, it was possible to demonstrate the bioactivity of the antibody after immobilization and presented a limit of detection (LOD) of 0.95 pg.mL<sup>-1</sup>. Also, the platform exhibited good reproducibility, high selectivity and specificity when subjected to another mycotoxin, Ochratoxin A (OCRA).

**Keywords:** Antibody. Mycotoxins. Biodevice. AFM. Electrochemical.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 01</b> – Estrutura química das principais micotoxinas                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 18 |
| <b>Figura 02</b> – Estruturas químicas das Aflatoxinas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 21 |
| <b>Figura 03</b> – Estrutura Ocratoxina A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 23 |
| <b>Figura 04</b> – Esquema representativo dos componentes de biossensores                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 25 |
| <b>Figura 05</b> – Esquema representativo dos tipos de biossensores                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 26 |
| <b>Figura 06</b> – Esquema representativo de um anticorpo IgG                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 29 |
| <b>Figura 07</b> – Representação esquemática de um voltamograma cíclico                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 30 |
| <b>Figura 08</b> – Esquema representativo do gráfico da resposta idealizada Nyquist (A) circuito equivalente do tipo Randles (B)                                                                                                                                                                                                                                           | 32 |
| <b>Figura 09</b> – Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente.                                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Figura 10</b> – Esquema representativo da montagem do biossensor                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 38 |
| <b>Figura 11</b> – Voltamogramas cíclicos (A/C) e Espectros de Impedância (B/D) para cada etapa de montagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1 e para cada etapa de testagem da plataforma para diferentes concentrações da aflatoxina. Curva de calibração (E) para o estudo com a AFB1 pura. Na imagem B, Inserção b etapa de montagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1. | 42 |
| <b>Figura 12</b> – Imagens AFM das etapas de modificação: Cys (A), Cys-ZnONps-Ac (B), Cys-ZnONps-Ac-BSA (C) e Cys-ZnONPs-Anti-AflaB1 (D)                                                                                                                                                                                                                                   | 43 |
| <b>Figura 13</b> – Espectros de Impedância(A) e Voltamogramas cíclicos (B) para cada etapa de montagem do biodispositivo elucidado.                                                                                                                                                                                                                                        | 45 |
| <b>Figura 14</b> – Voltamogramas cíclicos (A) e Espectros de impedância (B) após exposição do imunossensor a diferentes concentrações de AFB1 (1, 2, 5, 10, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Curva de calibração obtida usando os valores de $\Delta RCT\%$ (C). Circuito equivalente de Randles usado no Fit (D).                                                        | 46 |
| <b>Figura 15</b> – Voltamogramas cíclicos (A) e Espectros de Impedância (B) para cada etapa de testagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1 para diferentes concentrações de farinha de aveia contaminada com AFB1. RCT relativo (C) frente a diferentes concentrações de alimento contaminado.                                                                              | 47 |
| <b>Figura 16</b> – Investigação da especificidade (A) da plataforma anti-AFB1 para OCRA (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), farinha de aveia (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e AFB1 (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Voltamogramas cíclicos (B) para o estudo da estabilidade da plataforma Cys-ZnONps-AntiAFB1-B1-BSA.                                                                      | 49 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** – Principais micotoxinas, seus alimentos, seu limite aceitável nos países EUA, Brasil e Europa e suas principais consequências. 18
- Tabela 02** – Micotoxina e classificação da IARC. Fonte: Bueno (2015) adaptado 21
- Tabela 03** – Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância ajustados. As análises foram realizadas em triplicata. 44
- Tabela 04** – Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para o estudo de resposta do biossensor a diferentes concentrações de AFLA B1 no alimento contaminado. 48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |                                                |
|-----------|------------------------------------------------|
| Cys       | Cisteína                                       |
| NpsZnO    | Nanopartícula de óxido de zinco                |
| Anti-AFB1 | Anticorpo anti Aflatoxina B1                   |
| BSA       | Soro albumina bovina                           |
| VC        | Voltametria cíclica                            |
| EIE       | Espectroscopia de impedância eletroquímica     |
| EDC       | N-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida  |
| NHS       | N-hidroxissuccinimida                          |
| Ac        | Anticorpo                                      |
| ELISA     | Ensaio imunoenzimático                         |
| HPLC      | Cromatografia líquida de alta performance      |
| IARC      | Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer |
| mL        | Mililitro                                      |
| µg        | Micrograma                                     |
| ng        | Nanograma                                      |
| OCRA      | Ocratoxina                                     |

## SUMÁRIO

|           |                                                                      |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>  | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                    | <b>14</b> |
| <b>2</b>  | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                         | <b>18</b> |
| 2.1       | MICOTOXICOSES                                                        | 18        |
| 2.2       | AFLATOXINAS                                                          | 21        |
| 2.2.1     | Aflatoxina B1                                                        | 23        |
| 2.2.2     | Ocratoxina                                                           | 24        |
| 2.3.      | DETECÇÃO LABORATORIAL DAS AFLATOXINAS                                | 24        |
| 2.3.1     | Técnicas Cromatográficas                                             | 25        |
| 2.3.1.1   | <i>Cromatografia Em Camada Fina (TLC)</i>                            | 25        |
| 2.3.1.2   | <i>Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE) E Gasosa (MS)</i> | 26        |
| 2.3.2     | ELISA                                                                | 26        |
| 2.4.      | USO DE BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS                     | 27        |
| 2.4.1     | Tipos De Biorreceptores                                              | 27        |
| 2.4.1.1   | <i>Enzimas</i>                                                       | 29        |
| 2.4.1.2   | <i>Ácidos Nucleicos E Aptâmeros</i>                                  | 29        |
| 2.4.1.3   | <i>Anticorpos</i>                                                    | 30        |
| 2.5.      | MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE PARA CONSTRUÇÃO DE IMUNOSSENSORES          | 31        |
| 2.5.1     |                                                                      | M         |
|           | monocamada De Cisteína                                               | 31        |
| 2.5.2     |                                                                      | N         |
|           | nanopartículas Metálicas                                             | 32        |
| 2.6       | TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS DE ANÁLISE DE AFLA B1                        | 33        |
| 2.6.1     | Voltametria Cíclica (VC)                                             | 33        |
| 2.6.2     | Espectroscopia De Impedância Eletroquímica (EIE)                     | 35        |
| 2.6.3     | Microscopia De Força Atômica (AFM)                                   | 36        |
| <b>3.</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                     | <b>38</b> |
| 3.1       | OBJETIVO GERAL                                                       | 38        |
| 3.1.1     | Objetivos Específicos                                                | 38        |

|           |                                                                                                |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.</b> | <b>METODOLOGIA</b>                                                                             | <b>39</b> |
| 4.1       | MATERIAIS                                                                                      | 39        |
| 4.2       | MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE ZINCO                                   | 39        |
| 4.3       | DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NANOESTRUTURADO<br>CYS_NPSZNO_ANTIAFB1                              | 39        |
| 4.4       | DETECÇÃO DE AFB1 EM AMOSTRA DE FARINHA DE AVEIA                                                | 40        |
| 4.5       | MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA E VOLTAMETRIA ELETROQUÍMICA                                              | 40        |
| 4.6       | SIMULAÇÃO DO CIRCUITO EQUIVALENTE DAS ANÁLISES DE EIE                                          | 41        |
| 4.7       | MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA                                                                   | 41        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                  | <b>42</b> |
| 5.1       | CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA                                                                     | 42        |
| 5.2       | CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA                                                                   | 43        |
| 5.3       | BIOATIVIDADE DO SISTEMA                                                                        | 46        |
| 5.4       | DETECÇÃO DE AFB1 EM FARINHA DE AVEIA                                                           | 47        |
| 5.5       | ESTABILIDADE, REPRODUTIBILIDADE E SELETIVIDADE DA CAMADA SENSORA:<br>CYS_NPsZNO_ANTIAFLAB1_BSA | 50        |
| <b>6</b>  | <b>CONCLUSÃO</b>                                                                               | <b>52</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                             | <b>53</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As Micotoxinas (MTXs) são metabólitos secundários fúngicos capazes de causar danos, doenças ou até a morte, a seres humanos e animais (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Elas se desenvolvem em diversos produtos alimentícios a base de cereais, como aveia e milho, ou oleaginosas e especiarias, como também em leite e seus derivados, etc. (EVTUGYN *et al.*, 2018a; JIA *et al.*, 2019). A ingestão de alimentos com estas toxinas causa as chamadas Micotoxicoses (KHARAYAT & SINGH, 2018). Estudos da Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura (FAO) mostram que cerca de 25% da produção mundial de grãos está contaminada por essas toxinas. Dentre elas, a família das Aflatoxinas (AFs), subdividida em 4 (B1, B2, G1 e G2), é considerada como a mais nociva aos organismos. Sendo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o câncer (IARC) a aflatoxina B1 (AFB1) é classificada como Grupo 1 carcinogênico potente (ABNOUS *et al.*, 2017).

As toxinas supracitadas causam na agroindústria uma perda considerável de insumos e risco à saúde da população mundial. Por isso, o desenvolvimento de um método analítico sensível e preciso é necessário para garantir a segurança alimentar. Os métodos convencionais para a detecção das MTXs são as cromatografias e ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017; KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Estas metodologias apresentam boa sensibilidade, contudo são laboriosas, utilizam pessoal capacitado ou ainda necessitam de um pré tratamento de amostras (KHARAYAT & SINGH, 2018).

Uma metodologia alternativa para a mensuração de AFB1 são os biossensores, dispositivos simples, rápida resposta e de baixo custo (OLIVEIRA, Maria D.L. *et al.*, 2008). Existem biossensores com este objetivo sendo eles em sua maioria fluorescentes (JIA *et al.*, 2020), amperométricos (MA *et al.*, 2016), eletroquímicos (COSTA *et al.*, 2017). Imunossensores eletroquímicos na concepção de novos métodos analíticos para diagnóstico e controle de qualidade alimentar exibem certas vantagens em relação a outros, como alta seletividade e sensibilidade, baixo-custo, rápida resposta, capacidade de miniaturização além de serem aplicáveis a diversos analitos (LIU, D. *et al.*, 2020). Estes biossensores monitoram diversas biointerações, dentre elas a antígeno-anticorpo, valendo-se principalmente da especificidade do imunocomplexo formado na reação, atraem diversas pesquisas (COSTA *et al.*, 2017;

LIU, D. *et al.*, 2020). A biomolécula anticorpo é imobilizada em na plataforma para participar da interação bioespecífica, estas imunorreações são reconhecidas por sua alta sensibilidade e seletividade (LIU, D. *et al.*, 2020).

Além disso, diversos nanomateriais são utilizados para otimizar a sensibilidade dos biodispositivos (BEITOLLAHI *et al.*, 2020; XUE *et al.*, 2019). Os óxidos metálicos em nanoescala como óxido de magnésio, óxido de ferro, óxido de zinco são considerados promissores pelas propriedades biocompatíveis, nano-morfológicas diversificadas (DAI *et al.*, 2009 e KUMAR *et al.*, 2019). Ademais, são materiais funcionais, com propriedades eletroquímicas e otimização da cinética de transferência de elétrons (DAI *et al.*, 2009 e KUMAR *et al.*, 2019). Bem como, são materiais de fácil funcionalização para auxiliar na ligação com diversos biorreceptores, devido a simplicidade de acoplamento (DRIDI *et al.*, 2017). Os materiais em nanoescala como os óxidos de zinco (NpsZnO) são nanopartículas metálicas (MNPs) viáveis para várias aplicações no desenvolvimento de biossensores (DAI *et al.*, 2009; PICCA *et al.*, 2018). Nos últimos anos as NpsZnO foram utilizadas para a montagem de biodispositivos na análise clínica como exemplos GONČUKOVÁ *et al.* desenvolveu um, 2021; GRASSET *et al.*, 2003; SANTOS AVELINO, DOS *et al.*, 2018.

Na concepção de nanodispositivos eletroquímicos, a escolha das ferramentas analíticas é essencial para alcançar aparatos funcionais com elevada sensibilidade. Através das técnicas eletroquímicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), voltametria cíclica (VC), é possível caracterizar a modificação eletródica de sistemas de sensoramento, observando-se os processos reacionais entre a superfície do eletrodo e solução eletrolítica (OLIVEIRA, MARIA D.L. *et al.*, 2008; RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015). Em adição, por meio da microscopia de força atômica (AFM) é possível obter imagens da automontagem da plataforma a cada camada estruturada, visando sua caracterização estrutural e topográfica (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

Neste trabalho desenvolvemos um imunossensor eletroquímico baseado em NpsZnO modificadas com grupamentos aminas para a detecção de AFB1 em farinha de aveia. No biosistema proposto, o anticorpo é utilizado para a detecção de diferentes concentrações, em amostras de alimento contaminado com AFB1. Uma camada de cisteína (Cys) é adsorvida na superfície do eletrodo de ouro garantindo uma melhor adesão das NpsZnO. O imunossensor foi caracterizado por meio da voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e

microscopia de força atômica (AFM). Para análise de seletividade foi utilizado amostras contaminadas de Ocratoxina (OCRA). Sendo a OCRA um tipo de micotoxina encontrada em produtos alimentares, produzida por fungos do gênero *Penicillium* (Kharayat & Singh, 2018). Em resumo, esta plataforma exhibe estabilidade eletroquímica, seletividade e sensibilidade consideráveis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICOTOXICOSES

Micotoxina é uma palavra de origem grega “*mykes*” que significa fungo e do latim “*toxican*” que significa toxina. Este é um termo utilizado para designar toxinas alimentares fúngicas que podem levar a um quadro de intoxicação ou a morte de diversos seres vivos. Vale salientar, nem toda espécie fúngica é capaz de produzi-las, e a presença de um fungo nem sempre indica a sua existência, como também, pode ocorrer em um mesmo alimento mais de uma micotoxina (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). As micotoxinas podem se acumular em muitos alimentos, sendo esta contaminação predisposta a acontecer durante as etapas do processamento e consumo dos alimentos, variando desde a colheita até o armazenamento em suas residências (BENNETT; KLICH, 2003; KHARAYAT; SINGH, Y., 2018).

Fungos são microrganismos eucariontes uni ou pluricelulares, também denominados de mofo ou bolores, heterotróficos e aeróbios (TAÍS MAZIERO; DOS; BERSOT, 2010). Além disso, são seres capazes de se desenvolver em diversos ambientes. Por causa desta característica eles podem crescer em diversos produtos alimentares levando a produção de derivados, como o leite e o queijo, ou apenas a contaminação, pão mofado. Ou seja, capazes de provocar mudanças na cor, no sabor ou textura desses alimentos, interferindo diretamente na qualidade. Isto é observado de forma benigna por meio da fermentação, por exemplo, ou prejudicial através de alguns metabolitos secundários tóxicos a seres humanos e animais. Estes metabólitos, por sua vez, são denominados de micotoxinas, e quando ingeridos por seres vivos podem levar às chamadas Micotoxicoses (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016).

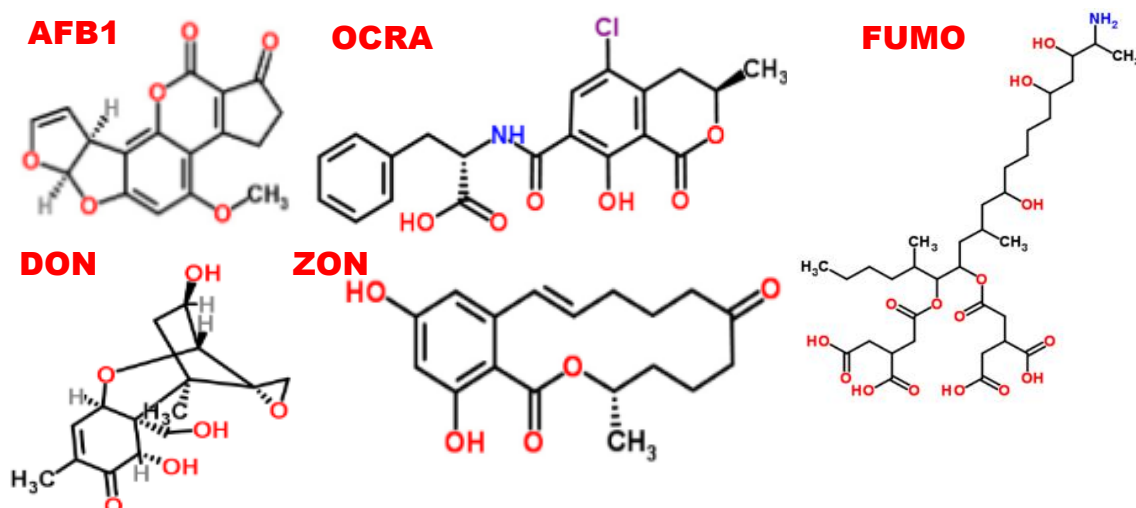
Segundo Benett (2003) as micotoxinas são equivalentes, na contaminação e risco de longo prazo, a metais pesados ou agrotóxicos já que também são viáveis para ocasionar envenenamento por meio natural, como também o grau de sua toxicidade está diretamente relacionado, analogicamente falando, aos efeitos da radiação dose e exposição. Logo a intoxicação por alimentos ricos em micotoxinas pode acontecer de maneira aguda ou subaguda, dependendo diretamente de vários fatores como a concentração da toxina ou ainda o sistema imunológico do ser vivo (TAÍS MAZIERO; DOS; BERSOT, 2010; BENNETT et al, 2003).

Devido a sua natureza química, MTXs são capazes de resistir a altas temperaturas, limpezas físicas como lavar e moer, além de serem quimicamente estáveis demonstrando assim seu risco a saúde mundial (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016). Ademais, estudos recentes indicam uma perda bilionária de dólares todos os anos devido a contaminação na agroindústria.

Como mencionado, além de seu efeito ocorrer de maneira semelhante a outras substâncias nocivas ao corpo, essas toxinas alimentares também podem ser absorvidas durante a cadeia alimentar de maneira direta, ingerindo grãos e produtos de origem vegetal, ou indiretamente, pela ingestão de carnes ou leite. Além disso, a produção dessas toxinas por estar intrinsecamente relacionada ao crescimento fúngico, é consequentemente dependente das condições climáticas da região para uma maior variedade de fungos crescendo na região (TAÍS MAZIERO; DOS; BERSOT, 2010). Logo, no Brasil o clima tropical úmido é propício para o desenvolvimento de muitas classes fúngicas (TAÍS MAZIERO; DOS; BERSOT, 2010).

Estas toxinas fúngicas são classificadas de acordo com seu radical livre, toxicidade (poder carcinogênico e teratogênico) ou ainda de acordo com seu peso molecular (em sua maioria apresentam baixo peso molecular). Existem mais de 300 a 400 tipos de micotoxinas variando de peso molecular e seu grau de toxicidade, destas 5 são as principais de importância médico sanitária, segundo estudo publicado em 1993 pela IARC (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). São elas: Aflatoxinas (AFs), Ocratoxina A (OCRA), Zearalenona (ZON), Desoxinivalenol (DON) e Fumonisinas (FUMO), na imagem 1 são apresentadas as diferentes composições de cada estrutura acima citada (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018; TAÍS MAZIERO; DOS; BERSOT, 2010).

Figura 01 – Estrutura química das principais micotoxinas.



Fonte: ALSHANNAQ et al, 2017.

Tabela 01 - Principais micotoxinas, seus alimentos, seu limite aceitável nos países EUA, Brasil e Europa e suas principais consequências.

| Micotoxina              | Commodities                                                                           | Espécie fúngicas      | País | Nível máximo tolerado ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) | Doenças relacionadas                                       |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| AFs<br>[B1, B2, G1, G2] | Sementes, oleaginosas, nozes, frutas secas, cereais, especiarias                      | <i>Aspergillus sp</i> | BR   | 0,5 – 5                                         | Carcinogênico, hepatite aguda, depressão do sistema imune. |
|                         |                                                                                       |                       | EUA  | 20                                              |                                                            |
|                         |                                                                                       |                       | UE   | 4 – 15                                          |                                                            |
| OTA                     | Cereais, frutas secas, café, cacau, vinho, cerveja, suco de uva, especiarias, alcaçuz | <i>Aspergillus sp</i> | BR   | 750 – 2000                                      | Carcinogênico, hepatotóxico, nefrotóxico, teratogênico     |
|                         |                                                                                       |                       | EUA  | 1000                                            |                                                            |
|                         |                                                                                       | <i>Penicillium sp</i> | EU   | 500 – 1750                                      |                                                            |
| ZEA                     | Cereais, produtos de panificação, óleo de milho                                       | <i>Fusarium</i>       | BR   | 20 – 600                                        | Atividade estrogênica                                      |
|                         |                                                                                       |                       | EUA  | -                                               |                                                            |

|      |                                         |                                                    |            |             |                                                                                                                             |
|------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                                         |                                                    | <b>EU</b>  | 2 – 1000    |                                                                                                                             |
| DON  | Cereais,<br>produtos de<br>panificação, | <i>Fusarium</i><br><i>Sp.</i>                      | <b>BR</b>  | 200 – 2000  | Efeitos radiomiméticos,<br>anorexia, ganho de<br>peso reduzido,<br>eficiência nutricional<br>alterada e<br>imunotoxicidade. |
|      |                                         |                                                    | <b>EUA</b> | 1000        |                                                                                                                             |
|      |                                         |                                                    | <b>UE</b>  | 500 – 1750  |                                                                                                                             |
| FUMO | Milho                                   | <i>Fusarium</i><br><i>Alternaria</i><br><i>sp.</i> | <b>BR</b>  | 200 – 5000  | agente cancerígeno,<br>hepatotóxico, causador<br>da<br>leucoencefalomalácia<br>em equinos                                   |
|      |                                         |                                                    | <b>EUA</b> | 2000 – 4000 |                                                                                                                             |
|      |                                         |                                                    | <b>UE</b>  | 800 - 4000  |                                                                                                                             |

Fonte: Própria autora, 2022.

Na tabela 01, é mostrado os limites para cada micotoxina, relacionando-a à legislação vigente em cada país/região, também é possível visualizar as principais doenças relacionadas à ingestão de alimentos contaminados (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017). Para estabelecer os máximos níveis tolerados (MNT) um comitê formado pela OMS (Organização das Nações Unidas) e a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) realizaram estudos para avaliação do risco das toxinas alimentares à saúde humana e animal. A partir dessa visão geral das micotoxinas e o que as micotoxicoses podem causar é evidente o risco à segurança alimentar (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017).

## 2.2 AFLATOXINAS

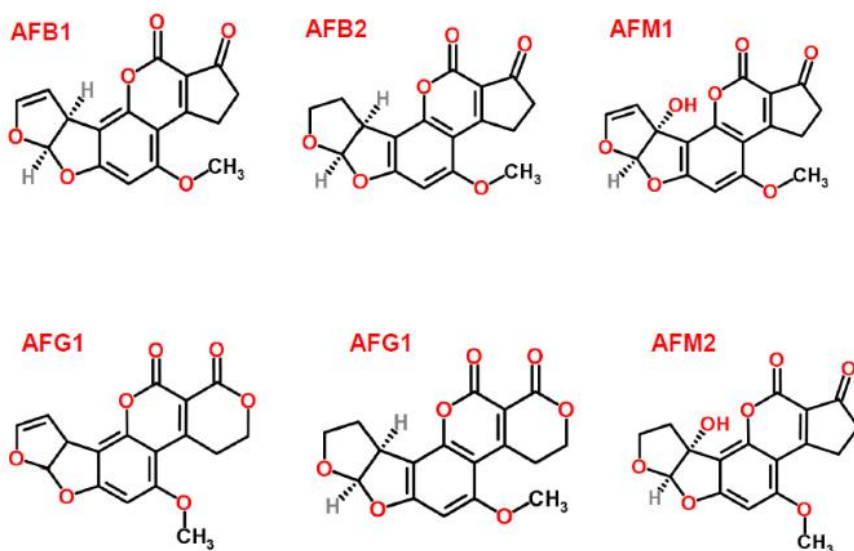
Estudos mais focados para as micotoxinas iniciaram-se a partir da década de 60, reflexo da morte de diversas aves, por causa da contaminação da ração com essas toxinas (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017). Posteriormente foi descoberto que um dos seus subtipos foi a causa desta situação. Os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasitus* são os principais produtores das Aflatoxinas (AFLA), são relativamente

simples comparadas a toxinas bacterianas, porém apresentam graves consequências ao bem-estar de seres vivos ao ingeri-las. As Aflatoxinas são uma família, subdividida em 4 grupos aflatoxina B1 (AFB1), aflatoxina B2 (AFB2), aflatoxina G1 (AFG1) e aflatoxina G2 (AFG2) (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Segundo estudos elas representam o grupo mais encontrado em alimentos contaminados por micotoxinas (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018; TAÍS MAZIERO; DOS; BERSOT, 2010). Diversos alimentos podem ser encontrados com AFLA (tabela 1).

Elas variam também de acordo com sua estrutura química (tabela 02) e seu grau de toxicidade, segundo a IARC. As AFB1 e AFB2 possuem metabólitos hidrolisados que afetam principalmente o leite e derivados, denominados respectivamente de AFM1 e AFM2 (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Esta situação ocorre quando um animal ingere pasto contaminado com Aflatoxinas B1/B2, então o citocromo P450 metaboliza-as gerando seus derivados, AFM1 e AFM2 (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017; ISMAIL *et al.*, 2018).

Seus efeitos adversos advêm principalmente da capacidade da AFLA de blindar o DNA das células, causando efeitos imunossupressores e induzindo infecções (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Além disso, elas possuem efeitos carcinogênicos, teratogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017). As AFLA possuem uma grande resistência a tratamentos convencionais de desintoxicação alimentar, seja para comida ou ração. Dentre esses processos há a pasteurização, o próprio ato de aquecer ou fritar o alimento e etc. (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017; ISMAIL *et al.*, 2018).

Figura 02 – Estruturas químicas das Aflatoxinas.



Fonte: ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017, adaptado.

Tabela 02 – Micotoxina e classificação da IARC.

| MICOTOXINA      | IARC  |
|-----------------|-------|
| Aflatoxinas     | 1,2 B |
| Ocratoxina      | 2 B   |
| Zearealone      | 3     |
| Desoxinivalenol | 3     |
| Fumonisin       | 2 B   |

Fonte: BUENO, 2015 (adaptado).

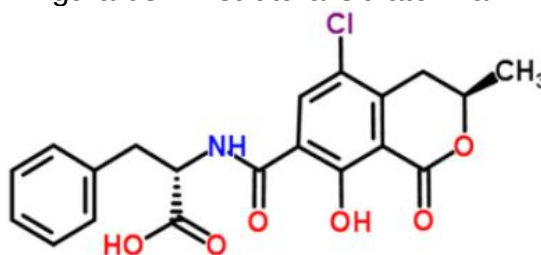
### 2.2.1 Aflatoxina B1

Dentre as aflatoxinas anteriormente citadas a AFB1 é a mais tóxica, carcinogênica e teratogênica do grupo. Ou seja, é a com maior potencial para desencadear hepatocarcinoma, em países subdesenvolvidos. É produzida por fungos do gênero *Aspergillus*. De acordo com IARC, 2002 é classificada como grupo 1 carcinogênico humano potente, sendo tida como a etiologia de carcinoma hepatocelular (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018).

### 2.2.2 Ocratoxina

Produzida por várias espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. É uma potente micotoxina nefrotóxica (BENNETT; KLICH, 2003; KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Sua descoberta se deu em meados de 1965 na África do Sul (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017). Nesta família destaca-se a Ocratoxina A (OCRA) (figura 03), classificada segundo a IARC como grupo 2 carcinogênico humano (tabela 01). Como observado nas demais micotoxinas também tem sua contaminação advinda de produtos de origem animal, como por exemplo o leite da vaca (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017). Pode ser encontrada em vários produtos alimentares como café, dentre outros (ver tabela 01). Sendo capaz de ser encontrada até mesmo no leite materno (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017; KHARAYAT; SINGH, Y., 2018).

Figura 03 – Estrutura Ocratoxina A.



Fonte: ALSHANNAQ et al, 2017.

Da mesma forma que a AFB1 apresenta efeitos imunossupressores, carcinogênicos, potencialmente teratogênicos entre outros (tabela 01) (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016; KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Esta micotoxina é capaz de atuar em diversas enzimas envolvidas na produção de energia ou até a nível nuclear. Sendo assim, é capaz de impactar a produtividade dos animais contaminados (galinhas e porcos) (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017).

### 2.3. DETECÇÃO LABORATORIAL DAS AFLATOXINAS

Desde a descoberta da AFB1 diversas pesquisas voltadas para sua detecção foram desenvolvidas. Visando a redução dos quadros de intoxicação pelo consumo de alimentos e rações contaminadas (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Por isso, existem diversos órgãos para regulamentar os níveis delas e garantir o mínimo de segurança (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016).

Há uma grande variação química dentro das micotoxinas ou até mesmo no subtipo da família como exemplo as AFLA anteriormente mostradas. Isso gera maiores desafios para extração e identificação das micotoxinas e ocorrem de maneira não isolada (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016). Além disso, matérias complexas estão em conjunto delas, o que pode ser um interferente para a análise (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017).

Uma metodologia multi alvo, avançar cada vez mais para análises rápidas, sensíveis e seletivas são os principais focos (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Tradicionalmente os métodos de detecção são divididos em duas categorias: Os de referência (avaliação quantitativa) e os métodos rápidos (avaliação qualitativa). Eles podem diferir no método de análise, porém as etapas de extração são semelhantes

(ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016). Dentre as técnicas temos cromatografia em camada fina (TLC); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a gasosa (CG) acopladas com detecção de fluorescência (FLD), ultravioleta (UV), ou espectrométrica de massa (MS); ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e biosensores.

### 2.3.1 Técnicas Cromatográficas

Em linhas gerais a cromatografia é um processo de separação e identificação de componentes de uma mistura. Essa técnica é baseada na migração dos compostos da mistura, os quais apresentam diferentes interações através de duas fases (móvel e estacionária)(CHAUHAN et al., 2016).

#### 2.3.1.1 Cromatografia Em Camada Fina (TLC)

Este é o método quantitativo de escolha para triagem de micotoxinas por apresentar uma boa sensibilidade e baixo custo, em comparação com HPLC. Em cromatografia de camada delgada com UV 365nm as AFB1 e AFB2 mostram fluorescência azul violeta e AFG1 e AFG2 fluorescência azul esverdeada(CHAUHAN et al., 2016).

A cromatografia em camada fina (TLC) consiste no uso de uma sílica fluorescente ou um gel impregnado com ácido. Com o avanço desta metodologia TLC de alto desempenho (HPTLC), TLC bidimensional e cromatografia de camada sobrepressão (OPLC), onde melhorias na camada de fase estacionária (HPTLC) e aplicação inovadora de fase móvel resultaram em precisões e precisão comparáveis aos métodos de HPLC (CHAUHAN et al., 2016).

#### 2.3.1.2 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE) e Gasosa (MS).

É o padrão ouro sendo utilizado principalmente para aflatoxinas, devido a sua alta acurácia e reprodutibilidade (LIU, D. et al., 2020). Ela consiste em uma bomba de alta pressão para eluir a fase móvel permitindo uma migração relativamente rápida. Desta forma, é capaz de realizar a análise de várias amostras em pouco tempo. Além disso, sendo acoplada com detecção de cromatografia líquida (LC) ou cromatografia

gasosa (CG) acoplada à detecção UV, FLD ou MS há uma melhoria significativa nessas respostas, por meio de uma dupla confirmação. Porém, essa é uma técnica que utiliza pessoal capacitado e seus equipamentos são de alto custo (LIU, D. *et al.*, 2020; CHAUHAN *et al.*, 2016).

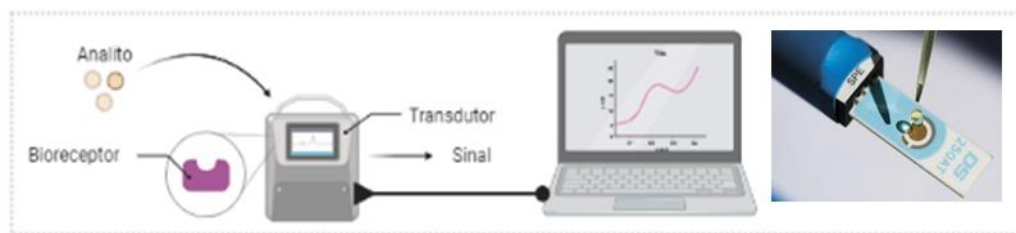
### 2.3.2 ELISA

Esta técnica é baseada na reação imunoenzimática antígeno-anticorpo, para detecção de substâncias presentes nas amostras. A presença de antígenos e/ou anticorpos no analito alvo é revelada pela produção de cor com a adição do substrato da enzima e de uma substância cromógena, indicando uma reação positiva (BAGGIANI, 2016). Graças a sua seletividade e sensibilidade, os imunoensaios são os preferidos para análise inicial de contaminação por micotoxinas (BUENO, D. *et al.*, 2015). Além disso, esses métodos são simples de operar, rápidos e portáteis (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016). Contudo, métodos imunoquímicos apresentam uma limitação no quesito de análises multiplex de micotoxinas (ANFOSSI; GIOVANNOLI; BAGGIANI, 2016; KHARAYAT; SINGH, Y., 2018). Apesar de ser uma metodologia relativamente simples, ela torna-se cara para o monitoramento de alimentos e também pode apresentar falso negativos, dependendo do analito (ALSHANNAQ; YU, J. H., 2017).

### 2.4. USO DE BIOSENSORES PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS

Na década de 60 o primeiro biossensor foi produzido. Este dispositivo revolucionou a biotecnologia por ser um método avaliativo rápido, de baixo custo, fácil manuseio e capacidade de uso em campo. Além disso, demonstrou uma alta seletividade e sensibilidade, um design simples comparado aos métodos tradicionais e anos após foi possível a miniaturização (portáteis) (KHARAYAT; SINGH, Y., 2018).

Figura 04 – Esquema representativo dos componentes de biossensores.

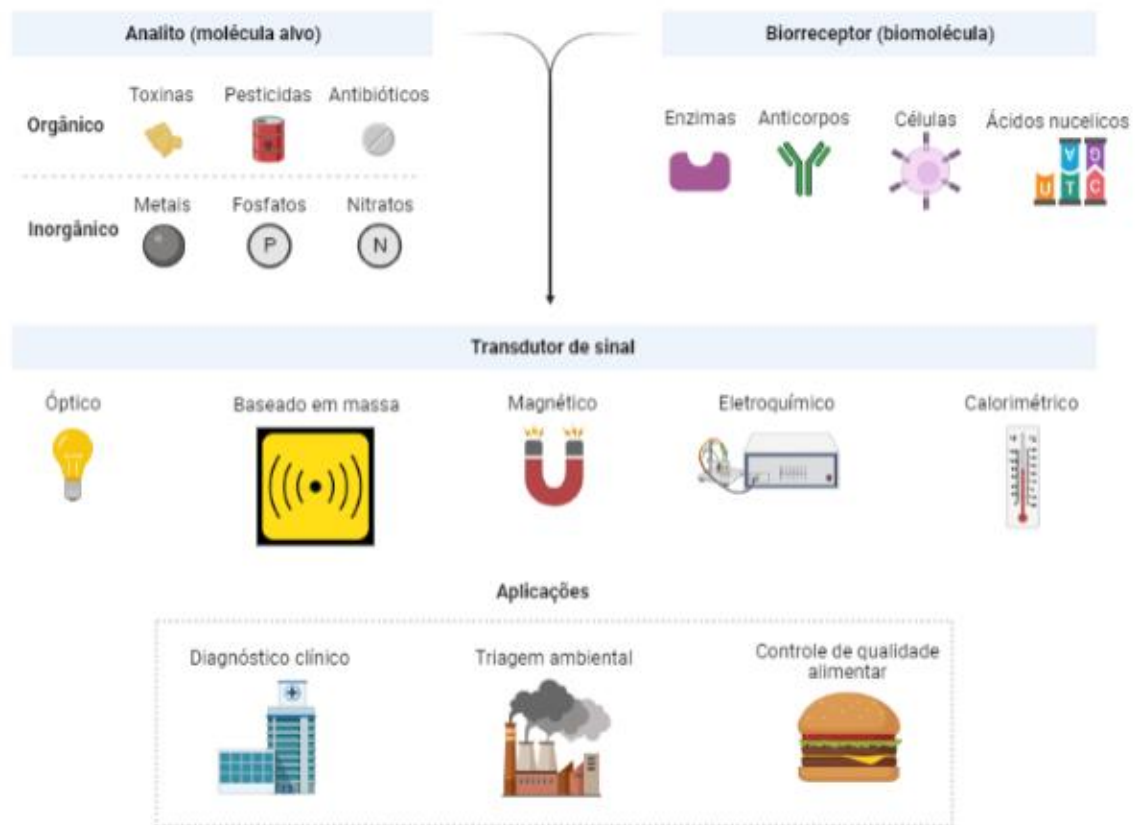


Fonte: Própria autora (2022).

São ótimos para demanda *point-of-care*, permitindo a análise fora do laboratório. São capazes de auxiliar na diminuição de acidentes industriais, contaminação alimentar, potenciais emergências e falsificação de remédio (EMÍLIO AMADOR SALOMÃO, 2018).

Biossensores são compostos por três partes principais, o transdutor, elemento de reconhecimento (molécula biológica) e amplificador (BUENO, D. et al., 2015; LIN; GUO, 2016; MALIK, P. et al., 2013). A detecção é baseada no transdutor (eletroquímico, piezoelétrico, calorimétrico, óptico) ser capaz de transformar ou traduzir o sinal biológico gerado no acoplamento, interação ou biorreconhecimento da molécula biológica (aptâmero, ácidos nucleicos, enzima, anticorpo) com sua molécula alvo (célula, vírus, bactéria, toxina) em um sinal mensurável, ou seja converter uma resposta biológica em um sinal elétrico (BUENO, D. et al., 2015; SANTANA OLIVEIRA et al., 2019). Na figura 3 é possível observar as diferentes constituições do biossensor e seu funcionamento.

Figura 05 – Esquema representativo dos tipos de biossensores: Biorreceptores, analitos, transdutores e aplicações.



Fonte: Própria autora (2022).

Esta biotecnologia surge no campo da toxicologia alimentar para revolucionar os métodos de avaliação das micotoxinas, em especial a AFB1. Ou seja, técnicas simples, robustas, de baixo custo e de fácil utilização (BUENO, D. et al., 2015; COSTA et al., 2017).

#### 2.4.1 Tipos De Biorreceptores

Os biodispositivos podem ser classificados de acordo com seus transdutores ou de acordo com os componentes de bioreconhecimento, temos os seguintes potenciais elementos a serem usados em biosistemas:

##### 2.4.1.1 Enzimas

Relacionados com o acoplamento de enzimas na superfície, para garantir seletividade e sensibilidade (SAAD CALIL; ROBERTO QUEIROZ DA SILVA, [s.d.]). As enzimas catalíticas são muito atraentes por causa da variedade de produtos de reação mensuráveis decorrentes da reação, que incluem prótons, elétrons, luz e calor. A enzima glucose oxidase (GOx) foi usada por Muthuchamy (2018) e acoplada ao uso de nanopartículas obteve uma excelente acurácia e estabilidade para a plataforma (Muthuchamy et al, 2018). Como também, por exemplo, os biossensores de bioluminescência são caracterizados pela utilização de certas enzimas com habilidade de emitir fótons como um subproduto de suas reações (LIU, D. et al., 2020; SAAD CALIL; ROBERTO QUEIROZ DA SILVA, [s.d.]). Ademais, como mostrado no estudo de Azri F, et al (2017) um imunossensor eletroquímico com LOD de 0,1 pg.mL<sup>-1</sup> e aplicado para análise dos seguintes alimentos: grãos de milho, grãos de soja e torta de dendê. Sendo este biodispositivo baseado na análise da enzima peroxidase, pois ela avalia o anticorpo secundário adsorvido na superfície (AZRI F, et al, 2017).

#### *2.4.1.2 Ácidos Nucleicos E Aptâmeros*

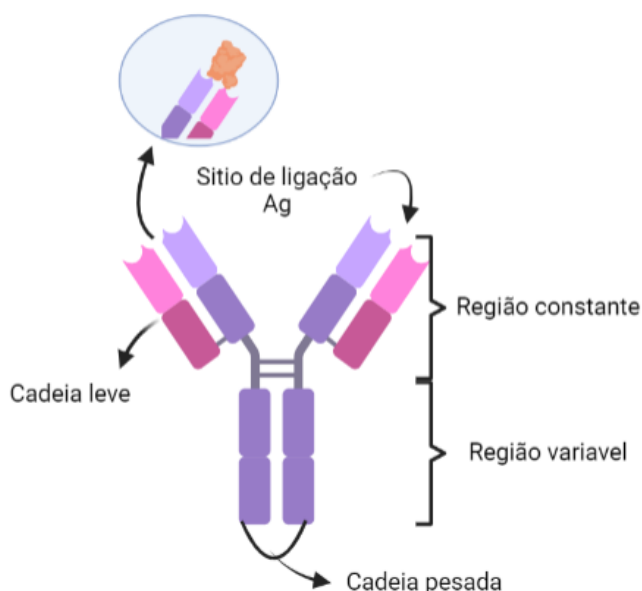
Utilizando-se da especificidade e seletividade existente da reação dos oligonucleotídeos (DNA, RNA e aptâmeros), denominada de hibridização (CHAUHAN et al., 2016). São utilizados para detecções na escala de pico molar e aplicáveis para detecção de cânceres ou íons. Os aptâmeros têm ganhado notoriedade como componente de reconhecimento (SANTANA OLIVEIRA et al., 2019). São definidos como sequências curtas de ácidos nucleicos capazes de se ligar a várias moléculas-alvo com alta afinidade e especificidade produzidos sinteticamente (SAAD CALIL; ROBERTO QUEIROZ DA SILVA, [s.d.]; SANTANA OLIVEIRA et al., 2019). Um exemplo deste biodispositivo foi produzido por Abnuos et al (2017) com o LOD de 2 pg.mg<sup>-1</sup> baseado em aptâmeros, para amostras de soro humano e suco de uva com AFB1.

#### *2.4.1.3 Anticorpos*

Ao ser imobilizado na superfície de qualquer sensor um antígeno/anticorpo ele

é denominado de imunossensor (SANTANA OLIVEIRA et al., 2019). A biointeração ocorrida neste meio é tida por meio da formação do imunocomplexo (LIU, D. et al., 2020). A especificidade deste dispositivo é graças à química do sítio de reconhecimento (antígeno/anticorpo). Contudo, essa metodologia tem alguns desafios para manter a bioatividade das moléculas aderidas na superfície e garantir sensibilidade ao sistema transdutor (SANTOS AVELINO, DOS et al., 2018). Na figura 06 é possível observar as partes que compõem o anticorpo. A proposta deste tipo de biossensor é obter alta seletividade e sensibilidade. Eles são uma técnica mais simples, sem passos muito laboriosos, utilizam menor quantidade de amostras e de reagentes, oposto do que fora apresentado sobre as metodologias clássicas de detecção (EVTUGYN et al., 2018b). A produção destas biomoléculas se dá pelas células B, compostas por glicoproteínas que formam uma cadeia leve e outra pesada. Estudos recentes de Ben Abdallah, et al (2019) desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico com faixa de detecção linear de  $50 \text{ fg.mL}^{-1}$  a  $5 \text{ ng.mL}^{-1}$  para a produção deste dispositivo.

Figura 06 – Esquema representativo da estrutura de um anticorpo e em destaque o sítio de ligação com antígeno.



Fonte: Própria autora (2022).

## 2.5. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE PARA CONSTRUÇÃO DE IMUNOSENSORES

A biofuncionalização da superfície de qualquer biodispositivo proposto é a

chave para a confecção de uma plataforma automontada seletiva, estável e sensível. Para este fim, diferentes metodologias são empregadas para a eficiente adsorção das camadas propostas, mas principalmente da camada responsável pelo bioreconhecimento (JANEGITZ, MARCOLINO JR e FATIBELLO-FILHO, 2007).

### 2.5.1 Monocamada De Cisteína

Na composição dos biodispositivos podem ser aplicadas as camadas automontadas para uma boa ligação com a superfície e consequentemente a montagem do biodispositivo. Elas são conhecidas como monocamadas automontadas (SAMs) capazes de controlarem a interface orgânico-inorgânico, pois fornecem de maneira simples e robusta um filme orgânico predefinido, estável em substratos inorgânicos e ultrafinos (GANJI, 2009; JONES et al., 2004).

Essas camadas de revestimento biocompatível podem ser aplicadas por exemplo em implantes, engenharia de tecidos e nos biossensores. É provável que a conformação das camadas por SAMs auxilie para evitar maior lixiviação ou arraste das estruturas presentes da superfície, principalmente de biodispositivos (GANJI, 2009; JONES et al., 2004).

A cisteína (Cys) é um aminoácido versátil pois seu grupo tiol garante uma ligação iônica com a superfície do metal (Au), de característica semi covalente, este componente é uma das principais escolhas para produção de plataformas nanoestruturadas (GANJI, 2009; JONES et al., 2004).

Um aminoácido não essencial participa da regulação gênica/ proteínas e da estrutura celular (GANJI, 2009). É quimicamente composta por um grupo sulfidril, um grupo amina e um grupo carboxila. Esta composição fornece sítios favoráveis para a utilização desta Cys seja para SAMs como também para funcionalização de nanoestruturas (JONES et al., 2004).

Como mostrado por COSTA et al., 2017 com sua plataforma para detecção de AFB1 em milho, foi utilizado a cys para fazer ligação covalente com a superfície do eletrodo de Au formando uma SAMs. Neste trabalho é mostrado o papel da cys como âncora para o acoplamento das demais camadas que compunham o dispositivo (COSTA et al., 2017).

Já o trabalho desenvolvido por OLIVEIRA et al., 2011 mostra um biossensor eletroquímico para lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), nele foi feita a funcionalização

da nanopartícula (Nps) para a formação de um compósito de L-cisteína-ouro (AuNpCys). Desta forma foi evidenciada outra aplicabilidade da cys sendo usada na funcionalização de uma nanopartícula para interface de eletrodo, imobilizado por interação eletrostática.

### 2.5.2 Nanopartículas Metálicas

Atualmente os nanomateriais estão integrando o desenvolvimento das plataformas biossensoras tornando-as mais eficientes graças às suas características únicas. Ademais, estes materiais em escala nanométrica são aplicados com sucesso como solventes, seja para extração ou preparo de amostras. Em decorrência disso, eles também foram usados na área de biodispositivos, tornando-os mais eficientes pois aumentam a superfície de contato para adesão de moléculas. Principalmente devido aos nanomateriais possuírem características únicas, aplicáveis a nível transdutor e biorreceptor, que estão sendo empregadas e desenvolvidas ao longo dos anos (KAILASA et al., 2019; XUE et al., 2019).

Dentre os nanomateriais, as nanopartículas metálicas (MNPS) têm ganhado notoriedade, pois suas características: alta capacidade de transferência de elétrons, fácil de controlar tamanho e formato, grande área de contato e metodologias simples para funcionalização. Além disso, para os imunossensores elas promovem uma superfície biocompatível e capazes de auxiliar na estabilização dos anticorpos, além de uma ótima cinética de elétrons resultando em um sinal amplificado para análise da molécula alvo (KAILASA et al., 2019; XUE et al., 2019).

As MNPS podem ser desenvolvidas baseadas em diversos nanomateriais dentre eles as NPs de ouro (AuNPs) destacam-se desde a descoberta desses nanomateriais graças às suas ótimas características catalíticas, magnéticas, ópticas e eletroquímicas, provaram ser ferramentas poderosas na aplicação de nanodispositivos. De maneira geral a MNPS podem, dependendo de sua composição, auxiliar com uma sensibilidade de detecção dos métodos de análise atinja o nível nanomolar, que é um limite de detecção muito menor do que o método de análise tradicional (MALHOTRA, Bansil D. et al., 2014; XUE et al., 2019).

Como também na família das MNPs destaca-se as nanopartículas de óxido de zinco, devido às características gerais anteriormente mencionadas. Seu baixo custo e sua alta capacidade de transferência de elétrons que a nível prático transforma o

biodispositivo com uma maior sensibilidade. Sua simplicidade para se obter partículas funcionalizadas também atraem diversas pesquisas na área como por exemplo os nanodispositivos desenvolvidos por BATISTA; OLIVEIRA, D. E., [2008.]; SIMÃO et al., 2020.

## 2.6. TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE AFB1

A construção de qualquer biodispositivo ou sensor eletroquímico perpassa por três etapas primordiais: preparação, caracterização e validação (testes), para avaliação em amostras. As duas primeiras citadas estão intrinsecamente ligadas, visto que a caracterização é realizada em várias etapas para o desenvolvimento do sensor, ou seja, é avaliado após adição de cada camada modificadora. Esta caracterização pode ser realizada por diversas técnicas não eletroquímicas e eletroquímicas (BRETT, 2022; STUPIN et al., 2021).

### 2.6.1 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria é uma técnica eletroanalítica classificada como dinâmica. A sua análise, na célula eletroquímica, ocorre em função de uma diferença de potencial (ddp), por meio dela é gerada uma corrente elétrica. Esta técnica eletroquímica se baseia em fenômenos que ocorrem na interface eletrodo de trabalho e solução eletrolítica adjacente a ele. Desta maneira, os dados são extraídos através da medição da magnitude da corrente elétrica, área de pico (GRIESHABER et al., 2008; PACHECO et al., 2013).

As células eletroquímicas na voltametria podem ser compostas por dois ou três, até mesmo quatro eletrodos(PACHECO et al., 2013). Neste trabalho, utilizamos a célula eletroquímica de 3 eletrodos, pois pode levar a melhor estabilidade nas mensurações. A tensão gerada ocorre entre eletrodo de trabalho e o de referência, obtendo-se a corrente resultante entre o eletrodo auxiliar e o de trabalho no qual os dados do analito são obtidos pela medição desta corrente (GRIESHABER et al., 2008; PACHECO et al., 2013).

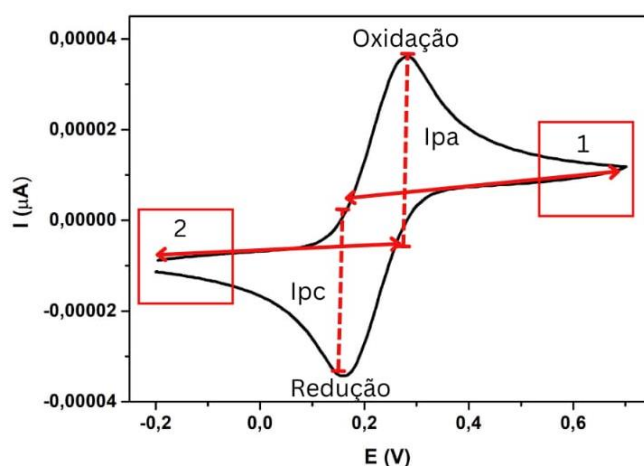
O principal parâmetro ajustado nas análises voltamétricas é o potencial (E), é medido com base na corrente resultante, logo:

## 1. $i = f(E)$

Esse registro de corrente é denominado de voltamograma e sua magnitude pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na superfície do biossensor. Por isso, existe a necessidade de conhecer o analito e observar se é capaz de sofrer alterações redox no potencial escolhido (GRIESHABER et al., 2008; PACHECO et al., 2013).

A VC trata-se de uma técnica amperométrica (GRIESHABER et al., 2008). Por existir diversas formas de causar uma variação de potencial, também existem diferentes formas de voltametria. Por exemplo, a voltametria cíclica (Fig. 07), uma das formas mais utilizadas e prática para obter informações sobre o potencial redox e as cinéticas de reação eletroquímicas. Analogicamente a velocidade de varredura de soluções de analitos pode influenciar a VC. Essa taxa ou velocidade de varredura é um fator fundamental, pois sua duração deve fornecer tempo suficiente para permitir que uma reação química significativa ocorra (GRIESHABER et al., 2008; PACHECO et al., 2013).

FIGURA 07 – Representação esquemática de um voltamograma cíclico correspondente ao desenvolvimento de uma reação redox faradaica. (1) Correção de oxidação que determina o limite positivo de trabalho do eletrodo; (2) correção de redução que determina o limite negativo de trabalho do eletrodo.



Fonte: Própria autora, 2022.

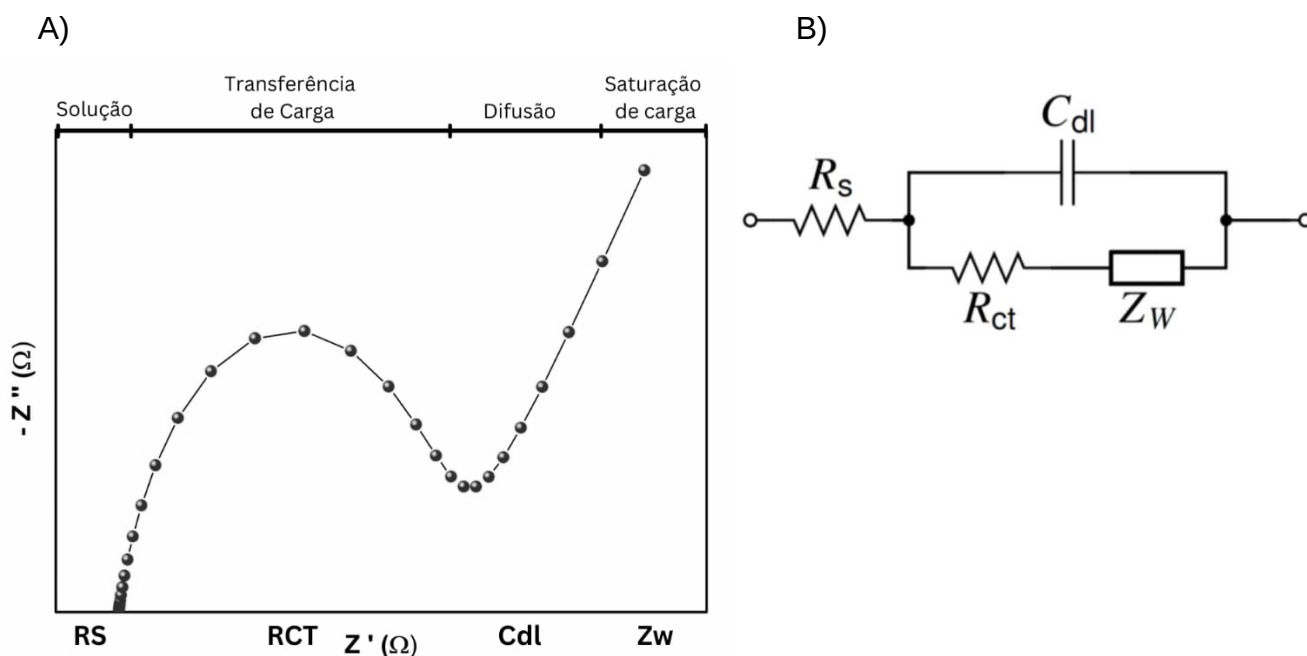
O tipo de voltamograma produzido depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, tornando a voltametria cíclica uma ferramenta

valiosa para estudos de mecanismos. A VC é capaz de proporcionar uma leitura de pontos de oxidação e redução por meio de uma varredura que inicia e termina no mesmo lugar (GRIESHABER et al., 2008).

### 2.6.2 Espectroscopia De Impedância Eletroquímica (EIE)

O gráfico de Nyquist (Fig. 08) é usado para a determinação da interação entre biomoléculas, comportamento de adsorção e propriedades interfaciais entre o eletrodo e a solução eletrolítica. O princípio desta técnica é aplicar um sinal elétrico alternado de pequena amplitude, capaz de gerar uma perturbação por meio de uma variação de frequência. Uma corrente alternada (ddp), quando é aplicada a esses elementos, a corrente resultante é obtida pela lei de Ohm. Então, a resposta do eletrodo é obtida medindo o deslocamento de fase dos componentes de corrente e tensão e pelas medições de suas amplitudes (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015; STUPIN et al., 2021).

Figura 08 – Esquema representativo do gráfico da resposta idealizada Nyquist (A) e circuito equivalente do tipo Randles (B).



Fonte: Própria autora (2022).

O gráfico de Nyquist, figura 08, é um gráfico paramétrico de duas funções, diagrama de Bode e gráfico de cole-cole, com o parâmetro sendo a frequência. Na

imagem 08 é possível observar o semicírculo formado, dele são dois parâmetros são obtidos da análise:  $RCT$  que é a medida do diâmetro e a frequência de relaxação característica,  $f_c$ , obtida no valor máximo do semicírculo. Em baixas frequências, região após o semicírculo, a impedância é caracterizada por processos de transporte de massa por difusão (CARVALHO, DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R., 2006; STUPIN et al., 2021).

Por meio deste gráfico, é possível se obter através de modelos matemáticos ou circuitos equivalentes os valores experimentais dessa reação eletroquímica. Sendo usado, por algumas pessoas dos estudos com biodispositivos, o circuito equivalente de Randles. Pois foi observado que ele se assemelha ao processo ocorrido na célula eletroquímica quando submetida a compostos biológicos e em sistemas eletroquímicos é possível mensurar a quantidade adsorvida na superfície sem promover a destruição de moléculas (CARVALHO, DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R., 2006; RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015; STUPIN et al., 2021).

EIE pode ser interpretada como uma resistência ou obstrução à passagem de corrente elétrica. Esta resistência é advinda das estruturas das moléculas e da carga do eletrodo (CARVALHO, DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R., 2006; RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015). Este circuito, figura 8 B, é constituído pelos seguintes componentes: resistência da solução ( $R_s$ ), capacitância de camada dupla ( $C_{dl}$ ), resistência à transferência de carga ( $RCT$ ) e impedância de Warburg ( $ZW$ ) como pode ser observado nos estudos de RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015; TEIXEIRA et al., 2014.

Nos biossistemas pautados em anticorpos, ela é uma técnica fundamental para ajudar no melhoramento da transferência de elétrons e na detecção desta biointeração, antígeno-anticorpo. Por fim, esta técnica possui diversas vantagens como baixo custo, rapidez, sensibilidade aumentada e facilidade de instrumentação (COSTA et al., 2017; GRIESHABER et al. Y. et al., 2008).

### 2.6.3 Microscopia De Força Atômica (AFM)

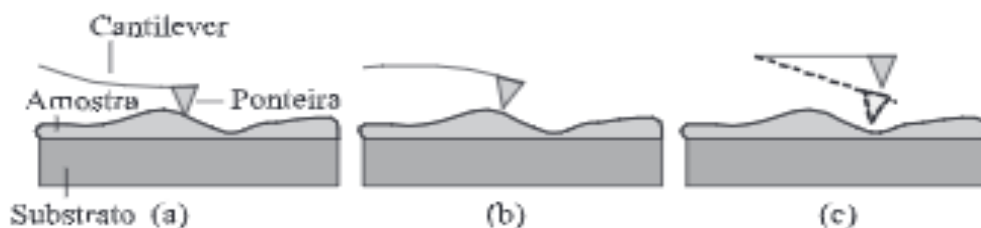
É uma técnica morfométrica, utilizada para se obter imagens bi/ tridimensionais das variações que ocorrem nas superfícies. Neste trabalho esta técnica foi aplicada para os biodispositivos que quando submetidos a diferentes camadas. Para obtenção de imagens de alta resolução topográficas, é empregada uma sonda constituída de

uma fina ponteira ligada a um cantilever, sendo este capaz de fazer o mapeamento da superfície do eletrodo. Então, é aplicado neste aparelho de microscopia o princípio da deflexão que consiste nas respostas das interações atômicas entre ponteira e substrato, utilizando o cantilever para transduzir as perturbações geradas (FERREIRA; YAMANAKA, 2006; GIESSIBL, 2003).

A base de funcionamento do AFM, e também seus componentes básicos, é uma varredura na superfície por uma ponta piramidal (ponteira) interligada a um cantilever flexível. Para ser possível alcançar a resolução atômica, a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos. A força de deflexão é proporcional à interação. Esta varredura na superfície é capaz de gerar diferentes tipos de variações topográficas como a formação de picos e vales. Por sua vez, elas são captadas no computador e obtendo-se as imagens (FERREIRA; YAMANAKA, 2006; TARARAM et al., 2015).

Conforme mostrado na Figura 09, a técnica do AFM pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente. Na pesquisa de biodispositivos pode ser aplicado o modo não contato visando mensuração da superfície sem o arraste das estruturas ali formadas (FERREIRA; YAMANAKA, 2006; TARARAM et al., 2015). Como mostrado nos estudos de COSTA et al., 2017; SANTOS AVELINO, DOS et al., 2018; SIMÃO et al., 2020. Neles são apresentados estudos para vários biodispositivos e o uso de diferentes receptores para detecção.

Figura 09 – Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente.



Fonte: FERREIRA; YAMANAKA, 2006.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar eletroquimicamente via EIE do Anticorpo (Anti-AFLA-B1) e NPsZnO para o desenvolver um imunossensor para detecção de aflatoxina B1 e aplicação em análise de alimentos.

##### 3.1.1 Objetivos Específicos

- Determinar parâmetros físico-químicos com uso de NPsZnO, Anti-AFB1 e da interação com Cys;
- Estudar a linearidade de resposta dos biosistemas Cys-NPsZnO e Cys-NPsZnO-AntiAFB1 frente a diferentes concentrações da aflatoxina B1 por meio da EIE;
- Avaliar o sistema sensor Cys-NPsZnO-AntiAFB1 frente à ocratoxina A como controle negativo;
- Avaliação da reprodutibilidade do sistema;
- Caracterizar a topografia das superfícies modificadas por meio de Microscopia de Força Atômica (AFM);
- Determinação da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) e da resistência à transferência de carga (RCT);
- Avaliar a estabilidade da plataforma em diferentes situações;
- Avaliar o sistema sensor frente ao alimento, farinha de aveia, contaminado com aflatoxina B1.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

N-hidroxisuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC), cisteína (Cys), óxido de zinco, anticorpo monoclonal (Anti-AFB1), Aflatoxina B1, APTES, metanol, Ocratoxina A (OCRA) (controle negativo) foram obtidos da Sigma/Aldrich, solução de  $\text{HNO}_3$  e farinha de aveia obtida do mercado local .

### 4.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE ZINCO

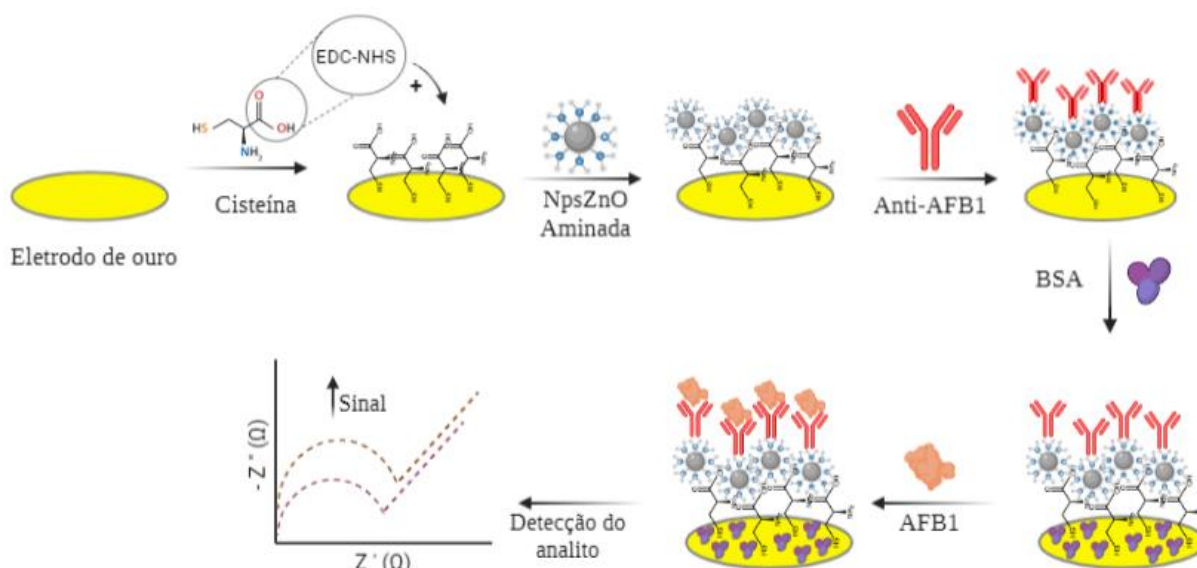
A obtenção da nanopartícula modificada com  $\text{NH}_2$  foi de acordo com a metodologia de (GRASSET et al., 2003; SANTOS AVELINO, DOS et al., 2018). Primeiro, 1,5 gramas da NpsZno foi disperso em 50 ml de água deionizada, com o pH ajustado para 6,5, através do uso da solução de  $\text{HNO}_3$  (2M) e posteriormente foi colocado em banho ultrassônico por 10 min para formação de uma mistura homogênea. Após esta etapa foi acrescentado 1 mL de APTES na solução e deixou-se em agitação por 24h. Subsequentemente, o excesso de APTES foi removido por lavagem com álcool e acetona (três vezes cada). O pó filtrado foi seco a  $60^\circ \text{C}$  e depois armazenado à temperatura ambiente. Antes do uso, a nanopartícula (NpsZnO 1 mg.  $\text{mL}^{-1}$ ) foi ressuspensa em metanol e colocado no banho ultrassônico para se obter uma mistura homogênea.

### 4.3 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NANOESTRUTURADO CYS\_NPSZNO\_ANTI-AFB1

Como mostrado na figura 10, o eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5m e exposto ao banho ultrassônico por 1 min em água deionizada, e posteriormente seco. Posteriormente, foi adicionando a superfície do eletrodo 4  $\mu\text{L}$  de Cys [50 MM] por 10 min. Após a adição deste composto, foram adicionados por 10 min os agentes ativadores, dos grupos carboxílicos, EDC [0,4 M] e NHS [0,8M] na proporção 1:1. Em seguida, foram imobilizadas as NPsZnO funcionalizadas com grupos amino por 5 min. Após a obtenção do eletrodo modificado com Cys-NPsZnO, este sistema foi submetido à incubação, via adsorção física, com o anticorpo anti-aflatoxina B1

(AntiAFB1). E por fim, foi avaliado frente a diferentes concentrações de AFLA B1 e do controle negativo OCRA. Todos os estudos foram conduzidos em triplicata à temperatura ambiente e caracterizados pela VC e EIE.

Figura 10 – Esquema representativo da montagem do biossensor.



Fonte: Própria autora (2022).

#### 4.4 DETECÇÃO DE AFB1 EM AMOSTRA DE FARINHA DE AVEIA

A amostra alimentar contaminada foi obtida de acordo com o procedimento de AMMIDA et al, 2004. Alíquotas (5 g) de pó de farinha de aveia foram enriquecidas com AFB1 em diferentes concentrações de  $1 \text{ pg.mL}^{-1}$  a  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$  e misturadas em vortex por 1 min na velocidade máxima. Em seguida, 25 mL do solvente de extração metanol foi adicionado, e misturado com um agitador rotativo por 15 min a  $100 \text{ rpm.min}^{-1}$ . As amostras foram então centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, e 1 mL do sobrenadante foi então diluído com PBS (1:10, v/v) e usado para a detecção de AFB1 por técnicas eletroquímicas.

#### 4.5 MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA E VOLTAMETRIA ELETROQUÍMICA

Os experimentos de EIE foram realizados em um potenciostato/galvanostato

Autolab PGSTAT 128N numa célula convencional de três eletrodos. O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo de ouro biomodificado, o eletrodo de platina foi usado como contra eletrodo e o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas em uma solução de ferro-ferricianeto de potássio numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (OLIVEIRA et al., 2008). Análises de VC foram varridas na faixa de potencial entre -0,2 e +0,7 V com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  (COSTA et al, 2017).

#### 4.6 SIMULAÇÃO DO CIRCUITO EQUIVALENTE DE Randles DAS ANÁLISES DE EIE

Os gráficos de impedância eletroquímica (gráficos de Nyquist) foram submetidos à análise de dados através do programa NOVA (COSTA et al, 2017), com o objetivo de explorar o comportamento interfacial do sistema Cys-NPsZnO-AntiAFB1-AFLA/OCRA.

#### 4.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

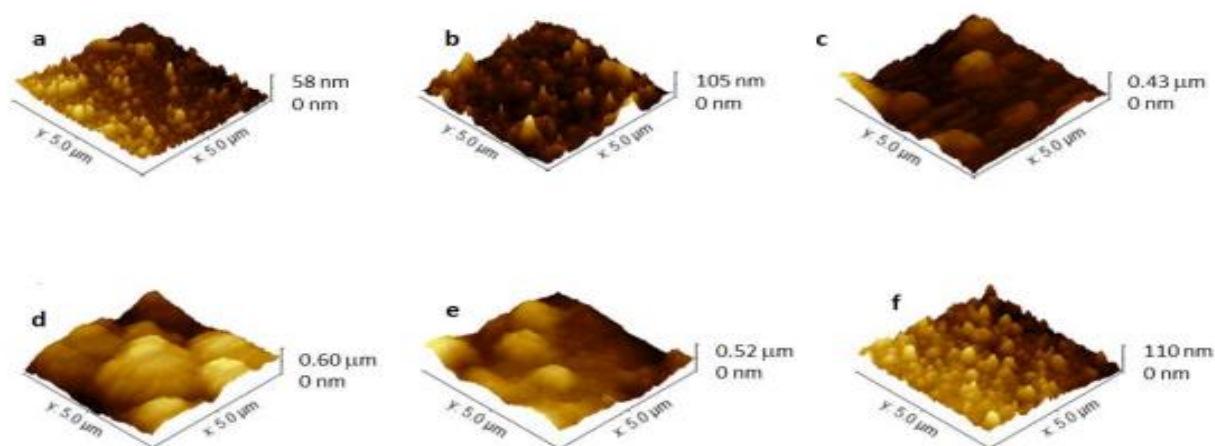
O estudo topográfico das etapas de montagem da plataforma sensora foram realizados através de um microscópio de força atômica SPM-9500 (Shimadzu, Japão) em modo não-contato. A resolução lateral foi definida em  $512 \times 512$  pixels em uma área de varredura de  $5 \times 5 \mu\text{m}$ . Por fim, as imagens foram processadas e analisadas utilizando o Software Gwyddion (NEČAS et al, 2012).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA

A técnica AFM foi utilizada para avaliar a morfologia do filme Cys-NPsZnO-AntiAFB1 e o reconhecimento de AFB1 isolada e em amostra alimentar. A Fig. 12 contém as superfícies modificadas evidenciado pelo aumento na altura média da topografia do sistema sensor. Na Figura 12a está o filme de Cys depositado, com altura máxima de 58 nm e a presença de picos e vales bem definidos. Trabalhos anteriores de Costa et al 2017 e Simão et al 2020, revelaram a formação de um filme denso de Cys, o que permite um melhor acoplamento das demais camadas. A Figura 12b mostra a plataforma com adição das NPsZnO e do biorreceptor, caracterizada por uma maior homogeneidade estrutural com altura máxima de 105 nm. Após o bloqueio dos sítios não funcionais com moléculas de BSA, a superfície do biossensor apto para detecção da aflatoxina é apresentada na Figura 12c. Foi observado que há formação de cumes globulares devido às características da proteína BSA e o aumento da resposta por meio da variação de rugosidade de 105 nm para 0,43  $\mu\text{m}$ . O reconhecimento de toxina pelo anticorpo AntiAFB1 é mostrado nas Fig. 12d–e. O sistema Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA mostrou boa interação tanto com a toxina isolada (altura média de 0,60  $\mu\text{m}$ ) quanto no alimento contaminado (altura média de 0,52  $\mu\text{m}$ ) em comparação com a toxina inespecífica (Fig. 12f). A diferença observada nos dados de altura é atribuída à especificidade do anticorpo à toxina específica (Singh et al., 2021).

Figura 12 – Imagens AFM das etapas de modificação: Cys (a), Cys-NpsZnO-AntiAFB1 (b), Cys-NpsZnO- AntiAFB1-BSA (c), Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA-Afla B1 (d) Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA-Aveia (e) e Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA-OCRA(f).



## 5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

A caracterização eletroquímica do biossensor anti-AFB1 foi examinada com espectros EIE e voltamogramas VC (Fig.13). Todas essas análises ocorreram através sonda redox ferro-ferricianeto de potássio ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ), para garantir uma excelente troca eletrolítica do sistema.

A Figura 13 A mostra os gráficos de Nyquist no qual o diâmetro do semicírculo formado corresponde ao RCT, podendo ser utilizado para mensurar as interações que ocorreram entre as superfícies do eletrodo de trabalho e solução eletrolítica. Enquanto sua parte linear é característica do processo de difusão que ocorre na superfície do eletrodo. Após modificação do eletrodo de ouro com a camada de cisteína houve um aumento no RCT de 195  $\Omega$  para 1573 k $\Omega$  (Fig. 13 A). Esta resposta é reflexo do processo de adsorção guiado pelo grupo tiol do aminoácido cisteína, o que afeta a transferência de elétrons entre a interface eletrodo-solução (DEMIRBAKAN; SEZGINTÜRK, 2017). Em adição, verifica-se que após ativação dos grupos carboxílicos das moléculas de Cys com EDC-NHS, houve uma imobilização adequada das NPsZnO, processo este refletido pelo incremento na condutividade do sistema (Liu et al., 2020; Simão et al., 2020). A deposição das NpsZnO é mostrada pela redução do RCT, com valor de 146  $\Omega$ . Isso se deve principalmente às características condutoras dos sistemas nanoparticulados. Sendo assim, ela é capaz de aumentar a janela de resposta do sistema, como também ser biocompatível e proporciona elevação de área superficial que possibilita maior imobilização da proteína de interesse (JAYAPRAKASAN et al., 2018; SIMÃO et al., 2020; XUE et al., 2019).

Para a ancoragem do biorreceptor, anti-AFB1, foi estabelecida uma adsorção física como mostrado no trabalho de Oliveira et al., 2008. Ele é apresentado por um aumento do RCT, de 332  $\Omega$ , e do diâmetro do semicírculo. Isso ocorre devido às características isolantes intrínsecas da proteína, como relatado por Kumar et al (2019). Na etapa final do processo de imobilização a superfície foi tratada com o BSA para bloquear os sítios ativos remanescentes. Foi verificado um aumento do sinal nos espectros de impedância no valor de 480 $\Omega$ . Os dados extraídos do circuito elétrico equivalente foram obtidos a partir da Fig. 13 A e 14 B podem ser visualizados na Tabela 03.

A Fig. 13 B mostra o voltamograma cíclicos dos picos de oxidação/redução do par redox e o processo de montagem do sensor. Nela é mostrada a gradual mudança

de respostas nos anódicos ( $I_{pa}$ ) e picos catódicos ( $I_{pc}$ ) formados, sendo mais evidente as variações na região anódica ( $I_{pa}$ ). O eletrodo de ouro limpo apresentou comportamento redox reversível característico de um sistema limitado por difusão. Uma diminuição dos picos na corrente é obtida após a adição da camada de Cys na superfície. A presença ZnONps aumenta a resposta amperométrica total do sistema corroborando com os dados impedimétricos, assim como as respostas para Anti-AFB1 e BSA.

Figura 13 – Espectros de Impedância(A) e Voltamogramas cíclicos (B) para cada etapa de montagem do biodispositivo elucidado.

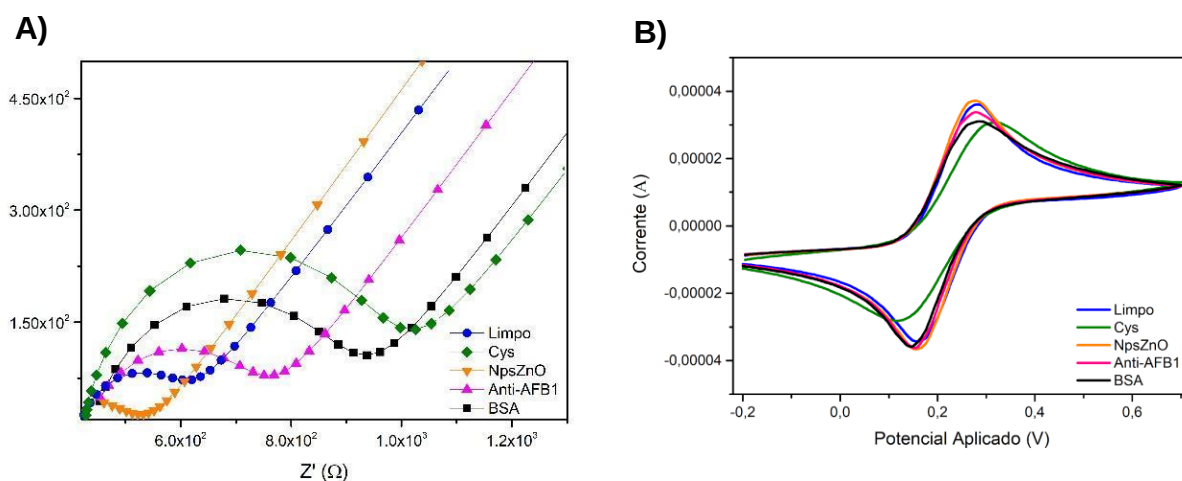


Tabela 03 – Montagem e bioatividade da plataforma nanoestruturada. Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância ajustados. As análises foram realizadas em triplicata.

| <b>Modificação eletródica</b>      | <b>Tempo de quimissorção</b> | <b>CPE (<math>\mu\text{Mho}</math>)</b> | <b>n</b>         | <b><math>R_{CT}</math> (<math>K\Omega</math>)</b> | <b><math>R_s</math> (<math>\Omega</math>)</b> | <b><math>Z_w</math> (<math>\mu\text{Mho}</math>)</b> |
|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Eletrodo de ouro                   | -                            | $3,73 \pm 0,1$                          | $0,789 \pm 0$    | $0,195 \pm 0,057$                                 | $470 \pm 0$                                   | $613 \pm 2,08$                                       |
| <b>Cys</b>                         | 15 min                       | $1,35 \pm 0,03$                         | $0,888 \pm 0$    | $1,573 \pm 0,152$                                 | $467 \pm 0$                                   | $649 \pm 2$                                          |
| <b>Cys-NPsZnO</b>                  | 5 min                        | $6,63 \pm 1,42$                         | $0,693 \pm 0$    | $0,146 \pm 0,0035$                                | $379 \pm 1$                                   | $741 \pm 1,53$                                       |
| <b>Cys-NPsZnO-Anti-Afla B1</b>     | 45 min                       | $3,24 \pm 0,74$                         | $0,737 \pm 0,03$ | $0,332 \pm 0,010$                                 | $420 \pm 6$                                   | $659 \pm 2,5$                                        |
| <b>Cys-NPsZnO-Anti-Afla B1-BSA</b> | 10 seg                       | $1,93 \pm 0,14$                         | $0,804 \pm 0,01$ | $0,480 \pm 0,007$                                 | $433 \pm 1,73$                                | $658 \pm 2$                                          |
| <b>Afla 1 mg.mL<sup>-1</sup></b>   | 30 min                       | $2,11 \pm 1,26$                         | $0,795 \pm 0,1$  | $0,633 \pm 0,11$                                  | $0,416 \pm 0,04$                              | $0,738 \pm 0,07$                                     |
| <b>Afla 2 mg.mL<sup>-1</sup></b>   | 30 min                       | $1,11 \pm 0,24$                         | $0,863 \pm 0,03$ | $0,676 \pm 0,14$                                  | $0,432 \pm 0,03$                              | $0,732 \pm 0,07$                                     |

|                                    |        |             |               |              |              |              |
|------------------------------------|--------|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Afla 5 mg.mL<sup>-1</sup></b>   | 30 min | 1,56 ± 0,45 | 0,825 ± 0,05  | 0,566 ± 0,01 | 0,407 ± 0    | 0,759 ± 0,05 |
| <b>Afla 10 mg.mL<sup>-1</sup></b>  | 30 min | 1,41 ± 0,35 | 0,876 ± 0,03  | 0,607 ± 0,09 | 0,409 ± 0,03 | 0,781 ± 0,04 |
| <b>Afla 50 mg.mL<sup>-1</sup></b>  | 30 min | 1,02 ± 0,23 | 0,862 ± 0,21  | 1,016 ± 0,39 | 0,442 ± 0,02 | 0,703 ± 0,04 |
| <b>Afla 100 mg.mL<sup>-1</sup></b> | 30 min | 1,38 ± 0,28 | 1,1414 ± 0,43 | 0,934 ± 0,47 | 0,429 ± 0,01 | 0,795 ± 0,02 |

### 5.3 BIOATIVIDADE DO SISTEMA

Dada a montagem e otimização da plataforma imunossensora proposta, foi realizado o estudo frente a diferentes concentrações de toxina pura ( $1 \mu\text{g/mL}^{-1}$  -  $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ ) em um tempo de incubação de 30 min. Pode-se observar, por meio da Fig. 14 que o sistema sensor foi responsivo à toxina AFB1, processo este refletido pelo aumento do diâmetro do semicírculo proporcional ao incremento da concentração (Fig. 14 B). Comportamento similar foi evidenciado nos voltamogramas cíclicos (Fig. 14 A) através da diminuição das ipa e ipc. Na Fig. 14 D é possível observar o circuito equivalente de Randles usado para a realização dos ajustes dos gráficos de impedância para extração dos elementos elétricos dos dados experimentais do EIE. Ademais, este circuito é composto por: resistência da solução ( $R_s$ ), capacitância de dupla camada elétrica ( $C_{dl}$ ) e impedância de Warburg ( $W$ ) (RIBEIRO et al., 2015). A partir do RCT extraído do circuito foi construída uma curva de calibração da resposta do imunossensor anti-AFB1 (Fig. 14 C). Os dados extraídos do circuito elétrico equivalente foram obtidos a partir da Fig. 13 A e 14 B podem ser visualizados na Tabela 03.

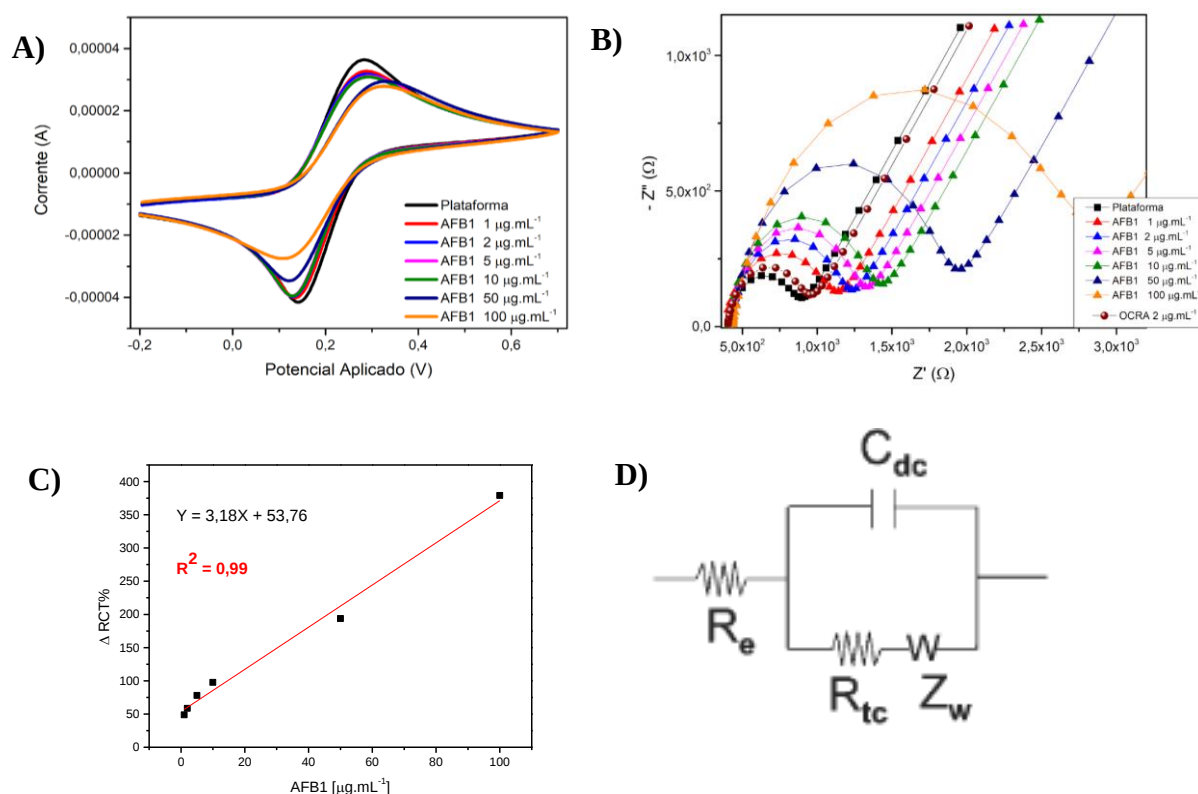
A Fig. 14 C mostra a relação linear do  $\Delta RCT\%$  e a concentração da toxina AFB1. A relação foi obtida a partir da equação:

$$2. \Delta RCT \% = \left( \frac{RCT (AFB1) - RCT (Anti-AFB1)}{RCT (Anti-AFB1)} \right) \times 100$$

Onde o RCT (Anti-AFB1) é o de toda a plataforma (Cys-NpsZnO-AntiAFB1-BSA), já o RCT (AFB1) é referente às mudanças de RCT após a incubação com amostras de AFB1. De acordo com Costa et al., 2017; Ma et al., 2016; Singh et al., 2021 é esperado um aumento do RCT proporcional à maior concentração de toxina adsorvida na superfície do biodispositivo. Logo, como foi visto na figura 14 C uma alta correlação entre os dados do sensor e a concentração do analito alvo demonstrado pelo  $R^2$  de 0,99 e LOD  $0,8085 \text{ pg.mL}^{-1}$ .

Figura 14 – Voltamogramas cíclicos (A) e Espectros de impedância (B) após exposição do imunossensor a diferentes concentrações de AFB1 (1, 2, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Curva de calibração obtida usando os valores de  $\Delta \text{RCT}\%$  (C).

Circuito equivalente de Randles usado no Fit (D).



#### 5.4 DETECÇÃO DE AFB1 EM FARINHA DE AVEIA

Os resultados das análises do sistema sensor com a farinha de aveia contaminada por AFB1 são mostrados na Figura 15 A e B e na Tabela 04. Estes resultados foram obtidos com base no processo de biointeração do sistema com concentrações de AFB1 (1  $\text{pg.mL}^{-1}$  a 500  $\text{pg.mL}^{-1}$ ). Sendo observadas mudanças no RCT e nas respostas eletroquímicas do biossensor de maneira linear a correlação entre o analito alvo e a plataforma. Esta tendência foi refletida no gráfico da Fig. 15 C baseado no cálculo do  $\Delta \text{RCT}\%$ . Este gráfico evidenciou uma excelente acurácia para esta plataforma, dado seu coeficiente de correlação  $R^2$  de 0,99 e seu LOD 0,8085  $\text{pg.mL}^{-1}$ . O cálculo de LOD foi obtido a partir da fórmula:

$$3.3 \sigma.s^{-1}$$

Nesta expressão, o  $s$  é o *slope*, o grau de inclinação da curva e  $\sigma$  é o desvio padrão do branco ( $n = 3$ ). Este valor de LOD foi similar ao encontrado por Costa et al., 2017 (LOD = 0,79 pg.mL<sup>-1</sup>).

Figura 15 – Voltamogramas cíclicos (A) e Espectros de Impedância (B) para cada etapa de testagem do sistema Cys-NPsZnO-Anti-AflaB1 para diferentes concentrações de farinha de aveia contaminada com AFB1. RCT relativo (C) frente a diferentes concentrações de alimento contaminado.

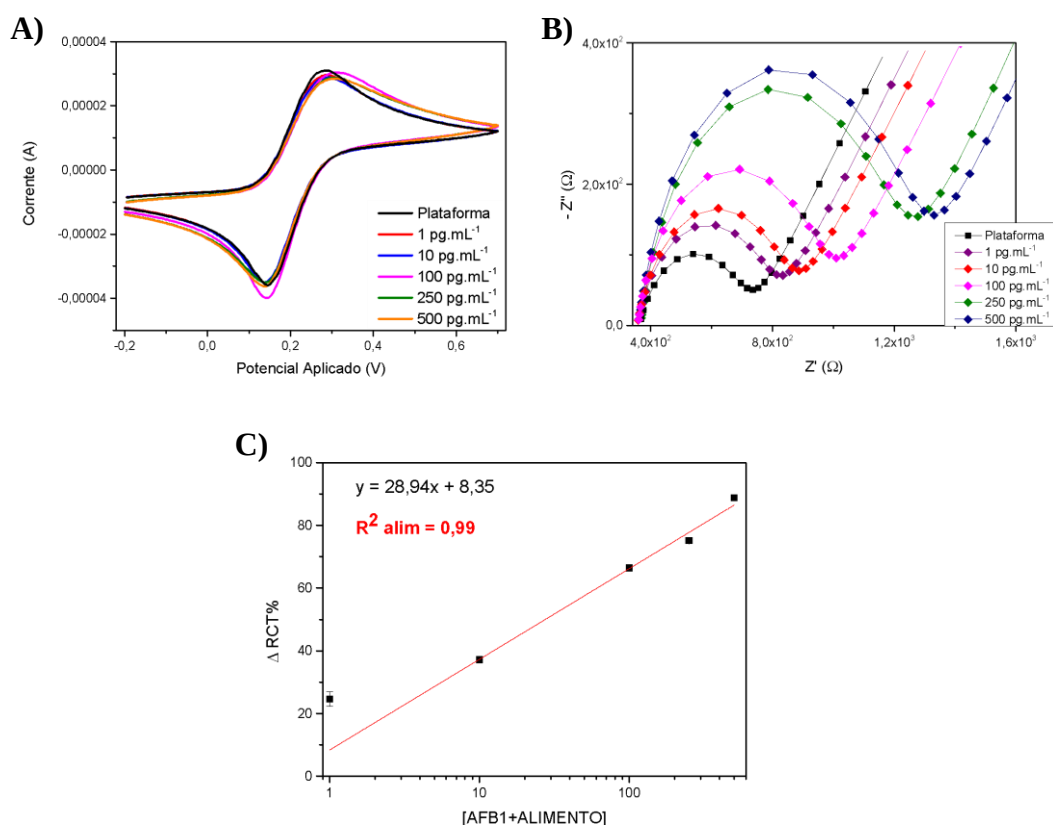


Tabela 04 – Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para o estudo de resposta do biossensor a diferentes concentrações de AFLA B1 no alimento contaminado.

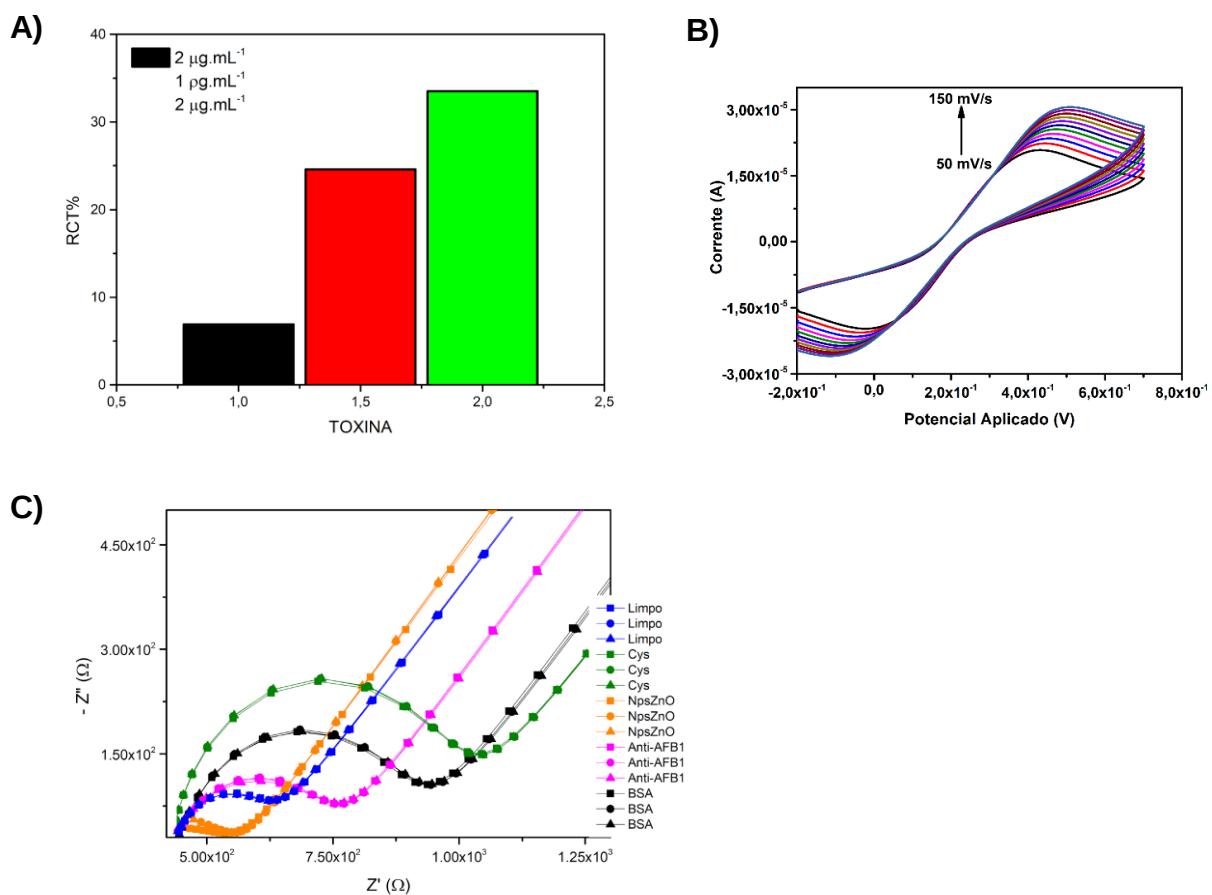
| Modificação eletródica       | Tempo de quimissorção | CPE ( $\mu\text{Mho}$ ) | n                | $R_{CT} (\Omega)$ | $R_s (\Omega)$    | $Z_w (\mu\text{Mho})$ |
|------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Sensor                       | -                     | $1,93 \pm 0,14$         | $0,804 \pm 0,01$ | $480,33 \pm 7$    | $433 \pm 1,73$    | $658 \pm 2$           |
| Afla 1 $\text{pg/mL}^{-1}$   | 30 min                | $1,97 \pm 0,41$         | $0,803 \pm 0,03$ | $598 \pm 13,78$   | $463 \pm 12,5$    | $661 \pm 4,5$         |
| Afla 10 $\text{pg/mL}^{-1}$  | 30 min                | $1,35 \pm 0,11$         | $0,85 \pm 0$     | $658,7 \pm 0,6$   | $458 \pm 1,15$    | $659 \pm 1$           |
| Afla 100 $\text{pg/mL}^{-1}$ | 30 min                | $1,35 \pm 0,03$         | $0,876 \pm 0$    | $798,67 \pm 2,52$ | $421,34 \pm 0,57$ | $724,33 \pm 2,08$     |
| Afla 250 $\text{pg/mL}^{-1}$ | 30 min                | $1,34 \pm 0,02$         | $0,834 \pm 0$    | $840,66 \pm 4,5$  | $366,3 \pm 0,57$  | $658,33 \pm 2,3$      |
| Afla 500 $\text{pg/mL}^{-1}$ | \30 min               | $1,23 \pm 0,02$         | $0,843 \pm 0$    | $906 \pm 3,78$    | $361 \pm 0$       | $689 \pm 2,08$        |

## 5.5 ESTABILIDADE, REPRODUTIBILIDADE E SELETIVIDADE DA CAMADA SENSORA: CYS-NPSZNO-ANTI AFB1-BSA

A seletividade da plataforma corresponde a capacidade do biossensor de detectar apenas a aflatoxina B1, seja em amostras alimentares ou pura. Neste trabalho, a especificidade foi avaliada aplicando-se a ocratoxina como controle negativo, como mostrado na Figura 16 A, em preto. Em verde está a resposta do biossensor para o analito AFB1 e em vermelho observa-se a variação do  $\Delta R_{CT}\%$  para a amostra de farinha de aveia contaminada com AFB1.

Por meio desta avaliação foi possível verificar a capacidade do sistema sensor de detectar AFB1 em alimento contaminado, além disso, mostra-se seletivo por não interagir com outro tipo de toxina. Por fim, o biodispositivo foi submetido a diferentes velocidades de varredura (50mV/s a 150mV/s) e 3 leituras consecutivas de EIE, a fim de ser avaliado sua reversibilidade e estabilidade eletroquímica. De acordo com os estudos de Kumar et al., 2019 e Singh et al., 2021 é observado que à medida que aumenta-se a velocidade de varredura há um incremento nos valores de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ . Desta forma, evidencia-se a reversibilidade redox por meio dos estudos de VC (Fig. 16 B) e estabilidade por meio da EIE (Fig 16 C).

Figura 16 – Investigação da seletividade (A) da plataforma anti-AFB1 para OCRA ( $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), farinha de aveia ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e AFB1 ( $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Voltamogramas cíclicos (B) e espectros de impedância (C) para o estudo da estabilidade da plataforma Cys-ZnONps-Anti-Afla B1-BSA.



## 6. CONCLUSÃO

A plataforma CYS/NPsZnO/AntiFB1/BSA foi projetada com êxito para a detecção sensível da Aflatoxina e sua caracterização eletroquímica foi realizada por meio das técnicas de VC e EIE. O sistema de bioanálise apresentou uma variação de resposta linear, para análises de toxina pura e com alimento contaminado, entre 1 pg.mL<sup>-1</sup> a 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Além disso, o biodispositivo obteve a detecção de baixas concentrações de toxina em alimentos contaminados (1 pg.mL<sup>-1</sup>). Desta forma, é possível observar um sensor sensível e seletivo para a detecção de AFB1. Em vista disso, o nanodispositivo imunossensor impedimétrico mostra-se como uma plataforma inovadora simples, de baixo custo e com possibilidade de uso em campo, sendo promissora para estudos de toxicologia alimentar.

## REFERÊNCIAS

- ABNOUS, K. et al. A new amplified  $\pi$ -shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin B1. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, p. 374–379, 15 ago. 2017.
- ALSHANNAQ, A.; YU, J.-H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, 13 jun. 2017.
- AMMIDA, N. H. S.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B1 in barley. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, n. 1–2, p. 159–164, 23 ago. 2004.
- ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 120–126, fev. 2016.
- AZRI, F.; SELAMAT, J.; SUKOR, R. Electrochemical Immunosensor for the Detection of Aflatoxin B1 in Palm Kernel Cake and Feed Samples. **Sensors**, v. 17, n. 12, p. 2776, 30 nov. 2017.
- BATISTA, H.; OLIVEIRA, D. E. **Programa De Pós-Graduação Em Ciência E Engenharia De Materiais Biossensor De Glicose Baseado Na Imobilização Da Glicose Oxidase Em Nanofibras De Óxido De Zinco**. [2020]. Disponível em: <<https://educapes.capes.gov.br/handle/capes/652436>>. Acesso em: 19 fev. 2020.
- BEN ABDALLAH, Z. et al. Development of an ultrasensitive label-free immunosensor for fungal aflatoxin B1 detection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 150, p. 107262, 15 out. 2019.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. **Mycotoxins**. **Clinical Microbiology Reviews**, 1 jul. 2003.
- BRETT, C. M. A. Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors. **Molecules**, v. 27, n. 5, 2022.
- BUENO, D. et al. Determination of Mycotoxins in Food: A Review of Bioanalytical to Analytical Methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 9, p. 728–774, 21 out. 2015.
- CHAUHAN, R. et al. Recent advances in mycotoxins detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 81, p. 532–545, 15 jul. 2016.
- COSTA, M. P. et al. Impedimetric immunoassay for aflatoxin B1 using a cysteine modified gold electrode with covalently immobilized carbon nanotubes. **Microchimica**

**Acta**, v. 184, n. 9, p. 3205–3213, 25 set. 2017.

DAI, Z. et al. Immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase on a tetragonal pyramid-shaped porous ZnO nanostructure for a glucose biosensor.

**Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 1286–1291, 1 jan. 2009.

DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia De Impedância Eletroquímica Aplicada Ao Estudo Das Reações Heterogêneas Em Ânodos Dimensionalmente Estáveis. **Quim. Nova**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 796-804, jul. 2006.

DEMIRBAKAN, B.; SEZGINTÜRK, M. K. A sensitive and disposable indium tin oxide based electrochemical immunosensor for label-free detection of MAGE-1. **Talanta**, v. 169, p. 163–169, 1 jul. 2017.

DE OVIEDO, U. **Supercondensadores Híbridos Assimétricos Con Especies Redox Inorgánicas**. [s.l.: s.n.].

DOS SANTOS AVELINO, K. Y. P. et al. Impedimetric gene assay for BCR/ABL transcripts in plasmids of patients with chronic myeloid leukemia. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 9, 1 set. 2018.

DRIDI, F. et al. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety and quality assessment. Em: **Nanobiosensors**. [s.l.] Elsevier, p. 167–204, 2017.

EMÍLIO AMADOR SALOMÃO, P. Production and Application of Biosensors: A Brief Review. v. 1373282, n. 3, p. 1–11, 2018.

EVTUGYN, G. et al. Affinity Biosensors for Detection of Mycotoxins in Food. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Academic Press Inc., 2018a. v. 85p. 263–310.

EVTUGYN, G. et al. Affinity Biosensors for Detection of Mycotoxins in Food. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Academic Press Inc., 2018b. v. 85p. 263–310.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137–142, fev. 2006.

GANJI, M. D. Density functional theory based treatment of amino acids adsorption on single-walled carbon nanotubes. **Diamond and Related Materials**, v. 18, n. 4, p. 662–668, abr. 2009.

GE, C. Y. et al. An electrochemical immunosensor based on a self- assembled monolayer modified electrode for label- free detection of  $\alpha$ -synuclein. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2020.

- GIESSIBL, F. J. Advances in atomic force microscopy. **Reviews of Modern Physics**, v. 75, n. 3, jul. 2003.
- GONČUKOVÁ, Z. et al. Sulfonated polyethersulfone membrane doped with ZnO-APTES nanoparticles with antimicrobial properties. **Reactive and Functional Polymers**, v. 162, 1 maio 2021.
- GRASSET, F. et al. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 360, n. 1–2, p. 298–311, 6 out. 2003.
- GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400–1458, 2008.
- GUTIERREZ, A. V. R.; HEDSTRÖM, M.; MATTIASSON, B. Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 12–17, 1 set. 2016.
- ISMAIL, A. et al. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. **Food Research International**, v. 113, p. 74–85, 1 nov. 2018.
- JAYAPRAKASAN, A. et al. Fabrication of an electrochemical biosensor with ZnO nanoflakes interface for methylglyoxal quantification in food samples. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 9–17, 1 fev. 2018.
- JIA, Y. et al. A label-free fluorescent aptasensor for the detection of Aflatoxin B1 in food samples using AIEgens and graphene oxide. **Talanta**, v. 198, p. 71–77, 1 jun. 2019.
- JIA, Y. et al. A metal-organic framework/aptamer system as a fluorescent biosensor for determination of aflatoxin B1 in food samples. **Talanta**, v. 219, p. 121342, 1 nov. 2020.
- JONES, D. P. et al. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 11, p. 1246–1248, ago. 2004.
- KAILASA, S. K. et al. Nanoparticle-integrated electrochemical devices for identification of mycotoxins. Em: **Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 275–296.
- KHARAYAT, B. S.; SINGH, Y. Mycotoxins in Foods: Mycotoxicoses, Detection, and Management. Em: **Microbial Contamination and Food Degradation**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 395–421.
- KUMAR et al. Biofunctionalized Nanostructured Yttria Modified Non-Invasive

Impedometric Biosensor for Efficient Detection of Oral Cancer. **Nanomaterials**, v. 9, n. 9, p. 1190, 22 ago. 2019.

LIN, X.; GUO, X. Advances in Biosensors, Chemosensors and Assays for the Determination of Fusarium Mycotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 6, p. 161, 24 maio 2016.

LIU, D. et al. Recent progress on electrochemical biosensing of aflatoxins: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. Elsevier B.V., 1 dez. 2020.

MA, H. et al. Disposable amperometric immunosensor for simple and sensitive determination of aflatoxin B 1 in wheat. **Biochemical Engineering Journal**, v. 115, p. 38–46, 15 nov. 2016.

MALHOTRA, B. D. et al. Nanomaterial-Based Biosensors for Food Toxin Detection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 3, p. 880–896, 1 out. 2014.

MALIK, P. et al. Nanobiosensors: Concepts and Variations. **ISRN Nanomaterials**, v. 2013, p. 1–9, 3 out. 2013.

MUTHUCHAMY, N. et al. High-performance glucose biosensor based on green synthesized zinc oxide nanoparticle embedded nitrogen-doped carbon sheet. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 816, p. 195–204, 1 maio 2018.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 13–19, 1 out. 2008.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. 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, n. 1, p. 194–201, 1 out. 2011.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Química**. Sociedade Brasileira de Química, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 516-537, 12 ago. 2013.

PICCA, R. A. et al. Enhanced stability of organic field-effect transistor biosensors bearing electrosynthesized ZnO nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 274, p. 210–217, 20 nov. 2018.

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, p. 529–546, ago. 2015.

SAAD CALIL, S.; ROBERTO QUEIROZ DA SILVA, P. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<https://pt.scribd.com/document/163813719/Simone-Saad-Calil-Paulo-Roberto-Queiroz>>. Acesso em: 19 nov. 2021.

SANTANA OLIVEIRA, I. et al. Biosensors for early detection of fungi spoilage and toxigenic and mycotoxins in food. **Current Opinion in Food Science**, [S.L.], v. 29, p. 64-79, out. 2019. Elsevier BV.

SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, 1 fev. 2020.

SINGH, A. K. et al. Dimanganese trioxide (Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) based label-free electrochemical biosensor for detection of Aflatoxin-B1. **Bioelectrochemistry**, v. 137, p. 107684, 1 fev. 2021.

STUPIN, D. D. et al. Bioimpedance Spectroscopy: Basics and Applications. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 7, n. 6, p. 1962–1986, 14 jun. 2021.

TAÍS MAZIERO, M.; DOS, L.; BERSOT, S. Review Micotoxinas Em Alimentos Produzidos No Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, n. 1, p. 89–99, 2010.

TARARAM, R. et al. Microscopia De Força Atômica: Uma Poderosa Ferramenta Para Caracterização Elétrica. Em: **Técnicas de Nanocaracterização**. Elsevier, 2015. p. 43–74.

TEIXEIRA, S. et al. Novel single-wall carbon nanotube screen-printed electrode as an immunosensor for human chorionic gonadotropin. **Electrochimica Acta**, v. 136, p. 323–329, 1 ago. 2014.

XUE, Z. et al. Recent advances in aflatoxin B1 detection based on nanotechnology and nanomaterials-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1069, p. 1–27, set. 2019.

YAGATI, A. K. et al. Label-Free Impedance Sensing of Aflatoxin B1 with Polyaniline Nanofibers/Au Nanoparticle Electrode Array. **Sensors**, v. 18, n. 5, p. 1320, 24 abr. 2018.