

Imunossensor baseado em nanopartículas de óxido de zinco e anti-Afla B1 para a detecção de farinha de aveia contaminada por micotoxinas

Immunosensor based on zinc oxide nanoparticles and anti-Afla B1 for the detection of oatmeal contaminated by mycotoxins

Inmunosensor a base de nanopartículas de óxido de zinc y anti-Afla B1 para la detección de avena contaminada por micotoxinas

Recebido: 03/11/2022 | Revisado: 26/04/2023 | Aceitado: 28/04/2023 | Publicado: 03/05/2023

Brenda Marques de Cerqueira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4719-8697>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: brenda.lab.cerqueira@gmail.com

César Augusto Souza de Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3271-2817>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: csrabdrade@gmail.com

Maria Danielly Lima de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8572-4846>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Resumo

A aflatoxina B1 (AFLA B1) é um tipo de micotoxina, tida como a mais carcinogênica do grupo. Observada em diversos alimentos, sua ingestão pode levar a longo prazo diversas patologias ou até mesmo a morte. Através do consumo de alimentos contaminados por seres humanos e animais. As técnicas existentes para sua detecção são baseadas em cromatografia ou ELISA. Elas são ferramentas com uma boa sensibilidade, contudo não atendem a necessidade da indústria alimentícia. Por isso, são necessárias novas metodologias para análise de alimentos contaminados. A proposta deste trabalho foi desenvolver imunossensor eletroquímico para detecção de AFLA B1. A plataforma sensora foi sintetizada por meio de camadas automontadas baseado na adsorção do anticorpo ligado a nanopartículas de óxido de zinco acopladas a cisteína na superfície do eletrodo de ouro. Logo, para montagem e otimização do biosistema, foi feito estudo de caracterização das camadas, bioatividade (seletividade, sensibilidade e estabilidade) e topografia da plataforma. Para isso, foram utilizadas as técnicas eletroquímicas voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, com microscopia de força atômica. Posteriormente submetido a amostras de farinha de aveia contaminada com diferentes concentrações de AFLA B1. O imunossensor fabricado apresentou uma resposta linear entre $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e limite de detecção $0,95 \text{ pg.mL}^{-1}$, sendo avaliado nos dois tipos de amostras. A plataforma exibiu boa reprodutibilidade e alta seletividade quando submetida a outra micotoxina, a Ocratoxina A.

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

Abstract

Aflatoxin B1 (AFLA B1) is a type of mycotoxin, considered the most carcinogenic of the group. Observed in several foods, its ingestion can lead to several pathologies or even death in the long term. Through consumption of food contaminated by humans and animals. The existing techniques for its detection are based on chromatography or ELISA. They are tools with good sensitivity, however they do not meet the needs of the food industry. Therefore, new methodologies are needed for the analysis of contaminated foods. The purpose of this work was to develop an electrochemical immunosensor to detect AFLA B1. The sensor platform was synthesized through self-assembled layers based on the adsorption of the antibody linked to zinc oxide nanoparticles coupled to cysteine on the surface of the gold electrode. Therefore, to assemble and optimize the biosystem, a study was carried out to characterize the layers, bioactivity (selectivity, sensitivity and stability) and topography of the platform. For this, electrochemical techniques, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, with atomic force microscopy were used. Subsequently subjected to samples of oat flour contaminated with different concentrations of AFLA B1. The manufactured immunosensor showed a linear response between $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and detection limit 0.95 pg.mL^{-1} , being evaluated in both types of samples. The platform exhibited good reproducibility and high selectivity when subjected to another mycotoxin, Ochratoxin A.

Keywords: Antibody; Mycotoxinoses; Biodevice; AFM; Electrochemical.

Resumen

La aflatoxina B1 (AFLA B1) es un tipo de micotoxina, considerada la más cancerígena del grupo. Observado en varios alimentos, su ingestión puede conducir a varias patologías o incluso a la muerte a largo plazo. A través del consumo de alimentos contaminados por humanos y animales. Las técnicas existentes para su detección se basan en la cromatografía o ELISA. Son herramientas con buena sensibilidad, sin embargo no cubren las necesidades de la industria alimentaria. Por lo tanto, se necesitan nuevas metodologías para el análisis de alimentos contaminados. El propósito de este trabajo fue desarrollar un inmunosensor electroquímico para detectar AFLA B1. La plataforma del sensor se sintetizó mediante capas autoensambladas a partir de la adsorción del anticuerpo ligado a nanopartículas de óxido de zinc acopladas a cisteína en la superficie del electrodo de oro. Por ello, para ensamblar y optimizar el biosistema se realizó un estudio de caracterización de capas, bioactividad (selectividad, sensibilidad y estabilidad) y topografía de la plataforma. Para ello se utilizaron técnicas electroquímicas, voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica, con microscopía de fuerza atómica. Posteriormente se sometieron a muestras de harina de avena contaminadas con diferentes concentraciones de AFLA B1. El inmunosensor fabricado mostró una respuesta lineal entre 1 µg.mL⁻¹ a 100 µg.mL⁻¹ y un límite de detección de 0.95 pg.mL⁻¹, siendo evaluado en ambos tipos de muestras. La plataforma mostró buena reproducibilidad y alta selectividad cuando se sometió a otra micotoxina, la ocratoxina A.

Palabras clave: Anticuerpo; Micotoxicosis; Biodispositivo; AFM; Electroquímico.

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, 2018; Robbins et al., 2000). 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., 2018; Jia et al., 2019). A ingestão de alimentos com estas toxinas causa as chamadas Micotoxicoses (Kharayat & Singh, 2018). Estudos recentes da Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura (FAO) mostra 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 representam 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 imuno-adsorção enzimática (ELISA) (Alshannaq & Yu, 2017; Kharayat & Singh, 2018). Estas metodologias apresentam boa sensibilidade, contudo são laboriosas, utilizam pessoal capacitado ou ainda necessitam de um pré-tratamento de amostras (Abnous et al., 2017; Kharayat & Singh, 2018).

Uma metodologia alternativa para a mensuração de AFB1 são os biossensores, dispositivos simples, rápida resposta e de baixo custo (Oliveira et al., 2008). Existem biossensores com este objetivo sendo eles em sua maioria fluorescentes (Jia et al., 2020), amperométricos (Ma et al., 2016), eletroquímicos (Azri et al., 2017; Costa et al., 2017), etc. Imunossensores eletroquímicos na concepção de novos métodos analíticos para diagnóstico e controle de qualidade alimentar exibe certas vantagens em relação a outros, como alta seletividade e sensibilidade, baixo-custo, rápida resposta, capacidade de miniaturização e aplicável a diversos analitos (Abnous et al., 2017; Liu et al., 2020; Wang et al., 2008). Estes biossensores monitoram as interações antígeno-anticorpo valendo-se principalmente da especificidade do imunocomplexo formado na reação, atraem diversas pesquisas (Costa et al., 2017; Liu et al., 2020). O anticorpo é imobilizado em uma plataforma para participar de uma interação bioespecífica, estas imunorreações são reconhecidas por sua alta sensibilidade e seletividade (Liu et al., 2020; Wang et al., 2008).

Diversos nanomateriais são utilizados para otimizar a sensibilidade dos biodispositivos (Xue et al., 2019 e Costa et al., 2017). Os óxidos metálicos nanoestruturados (por exemplo, óxido de magnésio, óxido de zinco, etc.) foram considerados promissores pelas propriedades biocompatíveis, nano-morfológicas diversificada, funcionais, eletroquímicas e otimização da cinética de transferência de elétrons (Dai et al, 2009 e Kumar et al, 2019). Além disso, são materiais de fácil funcionalização

para auxiliar na ligação com diversos biorreceptores, devido a simplicidade de acoplamento (Dridi et al., 2017). As nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO) são nanopartículas metálicas (MNPs) que possuem diversas morfologias, viabilizando várias aplicações para o desenvolvimento de biossensores (Dai et al., 2009). Nos últimos anos a NpsZnO foram utilizadas para a montagem de biodispositivos na análise clínica.

Neste trabalho desenvolvemos um imunossensor eletroquímico baseado em NpsZnO modificadas com grupamentos aminas para a detecção de AFB1 em farinha de aveia. O anticorpo é utilizado para a detecção de diferentes concentrações, em amostras de alimento contaminado com AFB1, por meio do sistema proposto. 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 ela um tipo de micotoxina encontrada em produtos alimentares, produzida por fungos do gênero *Penicillium* (Kharayat & Singh, 2018). Comparado com trabalhos anteriores, esta plataforma exhibe estabilidade eletroquímica, seletividade e sensibilidade consideráveis.

2. Metodologia

Materiais

N-hidroxisuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC), metanol (CH₃OH), cisteína (Cys), óxido de zinco (NpsZnO), anticorpo monoclonal (Anti-AFB1), Aflatoxina B1 (AFLA B1), (3-Aminopropil)triétoxissilano (APTES), Ocratoxina A (OCRA) (controle negativo), solução de ácido nítrico (HNO₃) foram obtidos da Sigma/Aldrich, água deionizada obtida no laboratório e farinha de aveia obtida do mercado local .

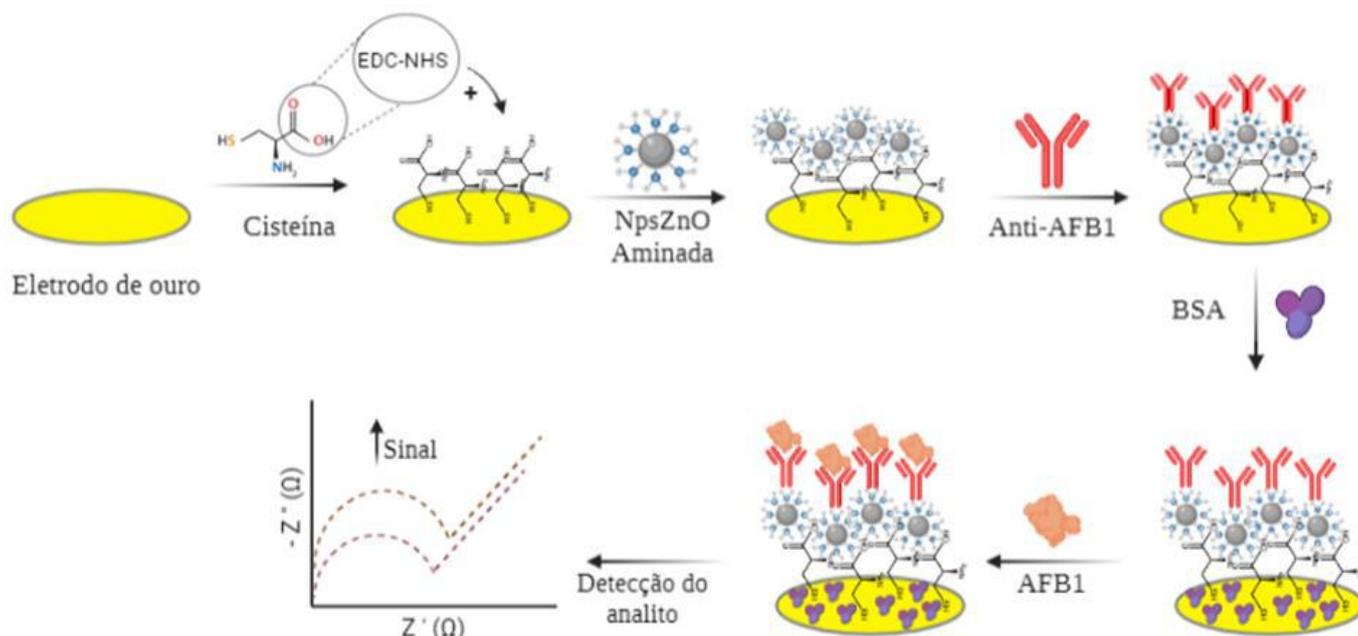
Modificação ca Superfície da Nanopartícula de Óxido de Zinco

A obtenção da nanopartícula modificada com NH₂ 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 HNO₃ (2M) e posteriormente foi colocado em banho ultrassônico por 10 min para formação de uma mistura homogênea. Após esta etapa foi acrescido 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° C e depois armazenado à temperatura ambiente. Antes do uso, a nanopartícula (NpsZnO 1 mg. mL⁻¹) foi ressuspensa em metanol e colocado no banho ultrassônico para se obter uma mistura homogênea.

Desenvolvimento do sistema nanoestruturado Cys_NPsZnO_Anti-AflaB1

O eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5m e sonificado por 1 minuto em água deionizada, e em seguida seco. Posteriormente, foi adicionando a superfície do eletrodo 4 µL de Cys por 15 min. Após a adição deste composto, foram adicionados os agentes ativadores EDC e NHS. 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 com o anticorpo anti-aflatoxina B1 (AntiAFB1), para ser avaliado frente a diferentes concentrações de AFLA B1 e do controle negativo OCRA (Figura 1). Todos os estudos foram conduzidos em triplicata à temperatura ambiente.

Figura 1 - Esquema representativo da montagem do biossensor.



Fonte: Autores (2023).

Deteção de AFLA B1 em amostra de farinha de aveia

A amostra alimentar contaminada foi obtida de acordo com o procedimento de Ammida et al., 2006. Alíquotas (5 g) de pó de farinha de aveia foram enriquecidas com AFLA B1 em diferentes concentrações 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 rpm.min. 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 deteção de AFLA B1 por técnicas eletroquímicas.

Medidas de impedância e voltametria eletroquímicas

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 entre -0,2 e +0,7 V com velocidade de varredura de 50 mV·s⁻¹ (Costa et al, 2017).

Simulação do circuito equivalente das análises de impedância eletroquímica

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.

Microscopia de Força Atômica

O estudo topográfico das etapas iniciais 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 × 512 pixels em uma área de varredura de 5 × 5 μm. Por fim, as imagens foram processadas e analisadas utilizando o Software

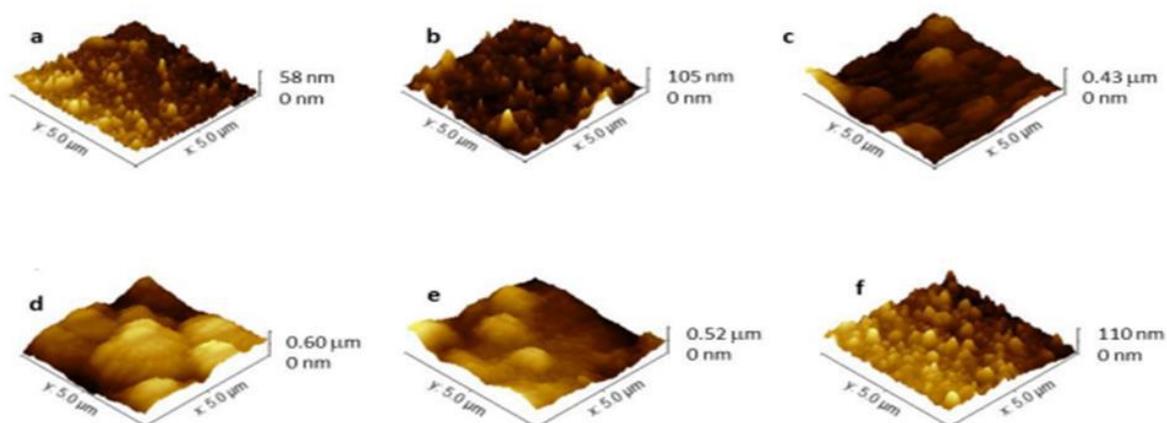
Gwyddion (Nečas et al, 2012).

3. Resultados e Discussão

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 Figura 2 revela imagens topográficas do AFM da superfície do sensor. Uma cobertura diferente da superfície do eletrodo foi obtida para os sistemas com a presença do filme de Cys e posterior adsorção das camadas subsequentes de NpsZnO, AntiAFB1, BSA e amostras (AFLA B1, aveia e OCRA). Trabalhos anteriores de Costa et al 2017 e Simão et al 2020, revelaram a formação de um filme bem denso de Cys, o que permite um melhor acoplamento das demais camadas. O reconhecimento de toxina pelo anticorpo AntiAFB1 é mostrado nas Fig. 2d–e. O sistema Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA mostrou boa interação tanto com a toxina isolada (altura média de 0,60 μm) como presente no alimento (altura média de 0,52 μm) em comparação com a toxina inespecífica (Figura 2f). A diferença observada nos dados de altura é atribuída à especificidade do anticorpo à toxina específica.

Figura 2 - Imagens das etapas de modificação AFM: Cys (a), Cys-NpsZnO- AntiAFB1 (b), Cys-NpsZnO- AntiAFB1-BSA (c), Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA-AFLAB1 (d) Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA-Aveia (e) e Cys-NPsZnO-AntiAFB1-BSA-OCRA (f).



Fonte: Autores.

Caracterização eletroquímica e avaliação da bioatividade do sistema

A caracterização eletroquímica do biossensor Anti-AFB1 foi examinada com espectros de impedância (EIE) e voltamogramas (VC) (Figura - 3). 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.

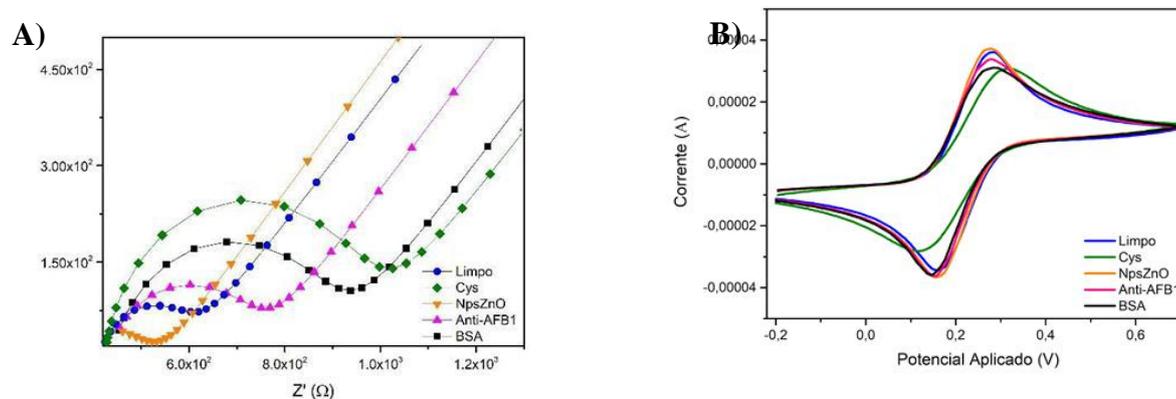
A Figura 3A mostra os gráficos de Nyquist no qual o diâmetro do semicírculo formado corresponde ao RCT (resistência a transferência de carga do sistema), podendo ser utilizado para mensurar as interações que ocorreram entre as superfícies do eletrodo de trabalho e solução eletrolítica. Enquanto sua parte linear é característica do processo de difusão que ocorre na superfície do eletrodo. Os dados extraídos do circuito elétrico equivalente, obtidos a partir da Figura 3A, podem ser visualizados no Quadro 1.

Após modificação do eletrodo de ouro com a camada de cisteína houve um aumento no RCT de 195 Ω para 1573 $\text{k}\Omega$

(Figura - 3A). 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 Ω . 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 para facilitar a adsorção da proteína de interesse (Jayaprakasan et al., 2018; Simão et al., 2020; Xue et al., 2019).

Figura 3 - Gráficos de Nyquist (A) e voltamogramas cíclicos (B) para cada etapa de montagem do biodispositivo elucidado.



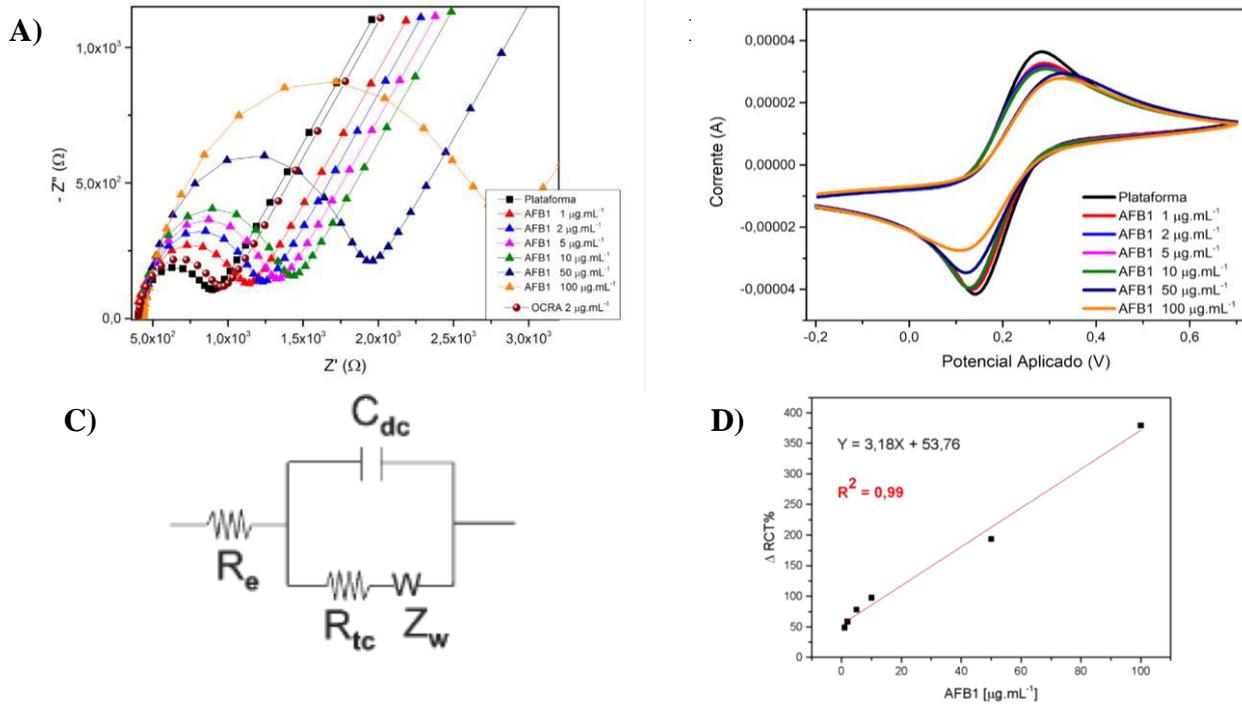
Fonte: Autores.

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 Ω , 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 Ω .

A Figura 3B 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 (Ipa) e picos catódicos (Ipc) formados, sendo mais evidente as variações na região anódica (Ipa). 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 NpsZnO aumenta a resposta amperométrica total do sistema corroborando com os dados impedimétricos, assim como as respostas para Anti-AFB1 e BSA.

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 Figura - 4 A, B e D que o sistema sensor foi responsivo à toxina AFLA B1, processo este refletido pelo aumento do diâmetro do semicírculo proporcional ao incremento da concentração (Figura - 4A). Comportamento similar foi evidenciado nos voltamogramas cíclicos (Figura - 4B) através da diminuição das Ipa e Ipc. Na Figura - 4C 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 (Rs), capacitância de dupla camada elétrica (Cdl) e impedância de Warburg (W) (Ribeiro et al., 2015).

Figura 4 - Espectros de impedância (A) e voltamogramas cíclicos (B) após exposição do imunossensor a diferentes concentrações de AFLA B1 (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).



Fonte: Autores.

A partir do RCT extraído do circuito foi construída uma curva de calibração da resposta do imunossensor anti-AFB1 frente a amostra de AFLA B1 pura (Figura 4D). Esta relação linear foi obtida a partir da equação:

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

no qual o RCT (Anti-AFB1) representa toda a plataforma (Cys-NpsZnO-AntiAFB1-BSA), já o RCT (AFB1) é referente às mudanças de RCT após a incubação com amostras de AFLA B1. 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.

Quadro 1 - Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância ajustados. As análises foram realizadas em triplicata.

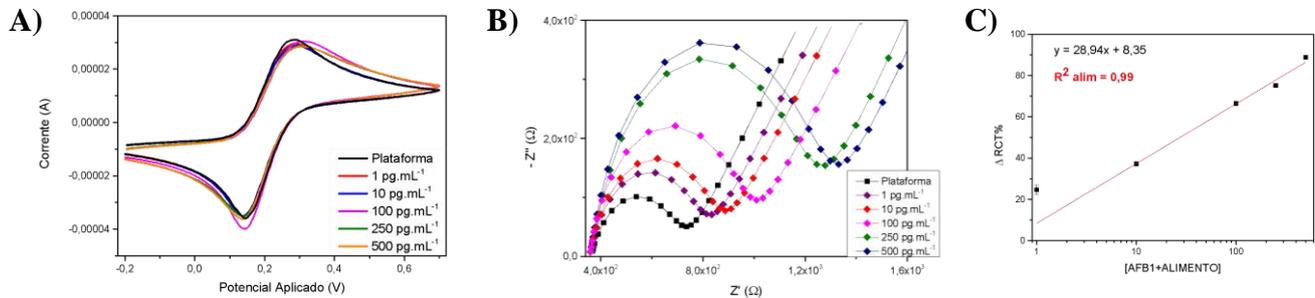
Modificação eletródica	Tempo de quimissorção	CPE (μMho)	n	R_{CT} (Ω)	R_s (Ω)	Z_w (μMho)
Eletrodo de ouro	-	$3,73 \pm 0,1$	$0,789 \pm 0$	$195 \pm 5,7$	470 ± 0	$613 \pm 2,08$
Cys	15 min	$1,35 \pm 0,03$	$0,888 \pm 0$	1.573 ± 152	467 ± 0	649 ± 2
Cys-NPsZnO	5 min	$6,63 \pm 1,42$	$0,693 \pm 0$	146 ± 35	379 ± 1	$741 \pm 1,53$
Cys-NPsZnO-Anti-Afla B1	45 min	$3,24 \pm 0,74$	$0,737 \pm 0,03$	332 ± 10	420 ± 6	$659 \pm 2,5$
Cys-NPsZnO-Anti-Afla B1-BSA	10 seg	$1,93 \pm 0,14$	$0,804 \pm 0,01$	480 ± 7	$433 \pm 1,73$	658 ± 2
Afla 1 mg.mL^{-1}	30 min	$2,11 \pm 1,26$	$0,795 \pm 0,1$	633 ± 11	$0,416 \pm 0,04$	$0,738 \pm 0,07$
Afla 2 mg.mL^{-1}	30 min	$1,11 \pm 0,24$	$0,863 \pm 0,03$	676 ± 14	$0,432 \pm 0,03$	$0,732 \pm 0,07$
Afla 5 mg.mL^{-1}	30 min	$1,56 \pm 0,45$	$0,825 \pm 0,05$	566 ± 10	$0,407 \pm 0$	$0,759 \pm 0,05$
Afla 10 mg.mL^{-1}	30 min	$1,41 \pm 0,35$	$0,876 \pm 0,03$	607 ± 90	$0,409 \pm 0,03$	$0,781 \pm 0,04$
Afla 50 mg.mL^{-1}	30 min	$1,02 \pm 0,23$	$0,862 \pm 0,21$	1.016 ± 390	$0,442 \pm 0,02$	$0,703 \pm 0,04$
Afla 100 mg.mL^{-1}	30 min	$1,38 \pm 0,28$	$1,1414 \pm 0,43$	934 ± 470	$0,429 \pm 0,01$	$0,795 \pm 0,02$

Fonte: Autores (2023).

Avaliação da plataforma sensora frente a farinha de aveia contaminada

Os resultados das análises do sistema sensor com a farinha de aveia contaminada por AFLAB1 são mostrados na Figura 5 A/B e no Quadro 2. Estes resultados foram obtidos com base no processo de biointeração do sistema com concentrações de AFLA B1 (1 pg.mL⁻¹ a 500 pg.mL⁻¹). Sendo observadas mudanças no RCT e nas respostas eletroquímicas do biossensor de maneira linear. Esta tendência foi refletida no gráfico da Figura 5C baseado no cálculo do ΔRCT%. Este plot evidenciou uma excelente acurácia para esta plataforma, dado seu coeficiente de correlação R² de 0,99 e seu LOD 0,8085 pg.mL⁻¹. O cálculo de LOD foi obtido a partir da fórmula: 3,3 σ.s⁻¹. Nesta expressão, o s é o slope, o grau de inclinação da curva e σ é o desvio padrão do branco (n = 3).

Figura 5 - Voltamogramas cíclicos (a) e Espectros de Impedância (b) para cada etapa de testagem do sistema Cys-NPsZnO-AntiAflaB1 para diferentes concentrações de farinha de aveia contaminada com AFB1. RCT relativo (c) frente a diferentes concentrações de alimento contaminado.



Fonte: Autores.

Quadro 2 - Simulação teórica dos resultados de espectroscopia de impedância para o estudo de resposta do biossensor a diferentes concentrações de AFLAB1 em farinha de trigo.

Modificação eletródica	Tempo de quimissorção	CPE (μMho)	n	R _{CT} (Ω)	R _s (Ω)	Z _w (μMho)
Sensor	-	1,93 ± 0,14	0,804 ± 0,01	480,33 ± 7	433 ± 1,73	658 ± 2
Afla 1 pg/mL ⁻¹	30 min	1,97 ± 0,41	0,803 ± 0,03	598 ± 13,78	463 ± 12,5	661 ± 4,5
Afla 10 pg/mL ⁻¹	30 min	1,35 ± 0,11	0,85 ± 0	658,7 ± 0,6	458 ± 1,15	659 ± 1
Afla 100 pg/mL ⁻¹	30 min	1,35 ± 0,03	0,876 ± 0	798,67 ± 2,52	421,34 ± 0,57	724,33 ± 2,08
Afla 250 pg/mL ⁻¹	30 min	1,34 ± 0,02	0,834 ± 0	840,66 ± 4,5	366,3 ± 0,57	658,33 ± 2,3
Afla 500 pg/mL ⁻¹	30 min	1,23 ± 0,02	0,843 ± 0	906 ± 3,78	361 ± 0	689 ± 2,08

Fonte: Autores (2023).

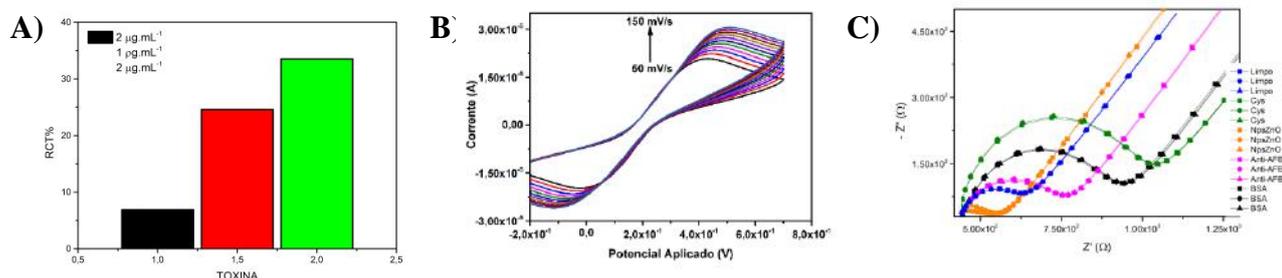
Reprodutibilidade, seletividade e estabilidade do biossensor AFLA B1

A reprodutibilidade de qualquer teste desenvolvido está diretamente relacionada à sua exatidão, isto é, sua capacidade de corresponder a concentração do analito desejada. Para este fim, o nosso biodispositivo foi testado em triplicata inter-teste, ou seja, respostas obtidas no mesmo dia, ver quadro 1 e 2. Já a seletividade da plataforma corresponde a capacidade do biossensor de detectar apenas a aflatoxina B1, seja em amostras alimentares ou pura. Neste trabalho, a seletividade foi avaliada aplicando-se a Ocratoxina como controle negativo, como mostrado na Figura 6 A, em preto. Em verde está a resposta do biossensor para o analito AFLA B1 e em vermelho observa-se a variação do ΔRCT% para a amostra de farinha de aveia contaminada com AFLA

B1. Por meio desta avaliação foi possível verificar a capacidade do sistema sensor de detectar AFLA B1 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 estabilidade eletroquímica. De acordo com os estudos de Kumar et al., 2019 e Singh et al., 2021 é observado à medida que aumenta-se a velocidade de varredura há um incremento nos valores de Ipa e Ipc. Desta forma, evidencia-se a reversibilidade redox por meio dos estudos de VC (Figura 6 B) e reprodutibilidade no perfil impedimétrico (Figura 6 C). Dessa forma, confirmamos a estabilidade da plataforma desenvolvida.

Figura 6 - Investigação da especificidade (a) da plataforma anti-AFB1 para OCRA (2 µg.mL⁻¹), farinha de aveia (1 pg.mL⁻¹) e AFB1 (2 µg.mL⁻¹). Voltamogramas cíclicos (b) para o estudo da estabilidade da plataforma Cys-ZnONps-AntiAfla B1-BSA.



Fonte: Autores.

4. Conclusão

O imunossensor foi desenvolvido com êxito para a detecção rápida e sensível da AFLA B1 e sua caracterização eletroquímica foi realizada por meio das técnicas de VC e EIE. O sistema de bioanálise apresentou uma variação de resposta linear entre 1 pg.mL⁻¹ a 100 µg.mL⁻¹. Além disso, o biodispositivo foi capaz de realizar a detecção de baixas concentrações de toxina em alimentos contaminados (1 pg.mL⁻¹). Portanto, o 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., Danesh, N. M., Alibolandi, M., Ramezani, M., Sarreshtehdar Emrani, A., Zolfaghari, R., & Taghdisi, S. M. (2017). A new amplified π-shape electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin B1. *Biosensors and Bioelectronics*, 94, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.028>
- Alshannaq, A., & Yu, J.-H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Azri, F., Selamat, J., & Sukor, R. (2017). Electrochemical Immunosensor for the Detection of Aflatoxin B1 in Palm Kernel Cake and Feed Samples. *Sensors*, 17(12), 2776. <https://doi.org/10.3390/s17122776>
- Costa, M. P., Frías, I. A. M., Andrade, C. A. S., & Oliveira, M. D. L. (2017). Impedimetric immunoassay for aflatoxin B1 using a cysteine modified gold electrode with covalently immobilized carbon nanotubes. *Microchimica Acta*, 184(9), 3205–3213. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2308-y>
- Dai, Z., Shao, G., Hong, J., Bao, J., & Shen, J. (2009). Immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase on a tetragonal pyramid-shaped porous ZnO nanostructure for a glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), 1286–1291. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.047>
- Demirbakan, B., & Sezgintürk, M. K. (2017). A sensitive and disposable indium tin oxide based electrochemical immunosensor for label-free detection of MAGE-1. *Talanta*, 169, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.076>
- dos Santos Avelino, K. Y. P., Frías, I. A. M., Lucena-Silva, N., de Andrade, C. A. S., & de Oliveira, M. D. L. (2018). Impedimetric gene assay for BCR/ABL transcripts in plasmids of patients with chronic myeloid leukemia. *Microchimica Acta*, 185(9). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2958-4>
- Dridi, F., Marrakchi, M., Gargouri, M., Saulnier, J., Jaffrezic-Renault, N., & Lagarde, F. (2017). Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety and quality assessment. In *Nanobiosensors* (pp. 167–204). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804301-1.00005-9>
- Evtugyn, G., Subjakova, V., Melikishvili, S., & Hianik, T. (2018). Affinity Biosensors for Detection of Mycotoxins in Food. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 85, pp. 263–310). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.03.003>

- Grasset, F., Saito, N., Li, D., Park, D., Sakaguchi, I., Ohashi, N., Haneda, H., Roisnel, T., Mornet, S., & Duguet, E. (2003). Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. *Journal of Alloys and Compounds*, 360(1–2), 298–311. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(03\)00371-2](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(03)00371-2)
- Jayaprakasan, A., Thangavel, A., Ramachandra Bhat, L., Gumpu, M. B., Nesakumar, N., Jayanth Babu, K., Vedantham, S., & Rayappan, J. B. B. (2018). Fabrication of an electrochemical biosensor with ZnO nanoflakes interface for methylglyoxal quantification in food samples. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0193-0>
- Jia, Y., Wu, F., Liu, P., Zhou, G., Yu, B., Lou, X., & Xia, F. (2019). A label-free fluorescent aptasensor for the detection of Aflatoxin B1 in food samples using AIEgens and graphene oxide. *Talanta*, 198, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.078>
- Jia, Y., Zhou, G., Wang, X., Zhang, Y., Li, Z., Liu, P., Yu, B., & Zhang, J. (2020). A metal-organic framework/aptamer system as a fluorescent biosensor for determination of aflatoxin B1 in food samples. *Talanta*, 219, 121342. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121342>
- Kharayat, B. S., & Singh, Y. (2018). Mycotoxins in Foods: Mycotoxicoses, Detection, and Management. In *Microbial Contamination and Food Degradation* (pp. 395–421). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00013-5>
- Kumar, Panwar, Kumar, Augustine, & Malhotra. (2019). Biofunctionalized Nanostructured Yttria Modified Non-Invasive Impedometric Biosensor for Efficient Detection of Oral Cancer. *Nanomaterials*, 9(9), 1190. <https://doi.org/10.3390/nano9091190>
- Liu, D., Li, W., Zhu, C., Li, Y., Shen, X., Li, L., Yan, X., & You, T. (2020). Recent progress on electrochemical biosensing of aflatoxins: A review. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 133). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115966>
- Ma, H., Sun, J., Zhang, Y., & Xia, S. (2016). Disposable amperometric immunosensor for simple and sensitive determination of aflatoxin B 1 in wheat. *Biochemical Engineering Journal*, 115, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.08.003>
- Nečas, D., & Klapetek, P. (2012). Gwyddion: An open-source software for SPM data analysis. In *Central European Journal of Physics* (Vol. 10, Issue 1, pp. 181–188). <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>
- Oliveira, M. D. L., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., & Diniz, F. B. (2008). Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2008.05.002>
- Ribeiro, D. V., Souza, C. A. C., & Abrantes, J. C. C. (2015). Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. *Revista IBRACON de Estruturas e Materiais*, 8(4), 529–546. <https://doi.org/10.1590/s1983-41952015000400007>
- Robbins, C. A., Swenson, L. J., Nealley, M. L., Kelman, B. J., & Gots, R. E. (2000). Health Effects of Mycotoxins in Indoor Air: A Critical Review. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, 15(10), 773–784. <https://doi.org/10.1080/10473220050129419>
- Simão, E. P., Silva, D. B. S., Cordeiro, M. T., Gil, L. H. V., Andrade, C. A. S., & Oliveira, M. D. L. (2020). Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. *Talanta*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120338>
- Singh, A. K., Dhiman, T. K., V.S., L. G. B., & Solanki, P. R. (2021). Dimanganese trioxide (Mn2O3) based label-free electrochemical biosensor for detection of Aflatoxin-B1. *Bioelectrochemistry*, 137, 107684. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107684>
- Teixeira, S., Conlan, R. S., Guy, O. J., & Sales, M. G. F. (2014). Novel single-wall carbon nanotube screen-printed electrode as an immunosensor for human chorionic gonadotropin. *Electrochimica Acta*, 136, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.05.105>
- Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., & Li, G. (2008). Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors*, 8, 2043–2081. www.mdpi.org/sensors
- Xue, Z., Zhang, Y., Yu, W., Zhang, J., Wang, J., Wan, F., Kim, Y., Liu, Y., & Kou, X. (2019). Recent advances in aflatoxin B1 detection based on nanotechnology and nanomaterials-A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1069, pp. 1–27). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.032>
- Yagati, A. K., Chavan, S. G., Baek, C., Lee, M.-H., & Min, J. (2018). Label-Free Impedance Sensing of Aflatoxin B1 with Polyaniline Nanofibers/Au Nanoparticle Electrode Array. *Sensors*, 18(5), 1320. <https://doi.org/10.3390/s18051320>