

**INSTITUTO FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS MACEIÓ
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

JÉSSICA DA CONCEIÇÃO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO, MODIFICADOS COM ÁCIDO
POLIXANTURÊNICO PARA DETECÇÃO DA AFLOTOXINA B1.**

MACEIÓ

2019

**INSTITUTO FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS MACEIÓ**

JÉSSICA DA CONCEIÇÃO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO MODIFICADOS COM ÁCIDO
POLIXANTURÊNICO PARA DETECÇÃO DA AFLOTOXINA B1.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial
para obtenção de grau do Curso Superior de Licenciatura em Química.

Prof. Orientador: Dr. Phabyanno Rodrigues Lima

MACEIÓ

2019



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Instituto Federal de Alagoas
Campus Maceió
Biblioteca Benevides Monte

S586d

Silva, Jéssica da Conceição.

Desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em eletrodos impressos de carbono, modificados com Ácido Polixanturênico para detecção da Aflotoxina B1 / Jéssica da Conceição Silva. – 2019.

1 CD-ROM: il., color. ; (1 arquivo : 24 KB).

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 59 folhas, acondicionado em caixa acrílica (12,5 cm x 14 cm).

Orientação: Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Instituto Federal de Alagoas, *Campus Maceió*, Maceió, 2019.

1. Química. 2. Sensor eletroquímico. 3. Ácido Xanturênico. 4. Aflotoxina B1. I. Título.

CDD: 541.37

Franciane Monick Gomes de França
Bibliotecária
CRB-4/1831

FOLHA DE APROVAÇÃO

JÉSSICA DA CONCEIÇÃO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM
ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO, MODIFICADOS COM ÁCIDO POLI-
XANTURÊNICO PARA DETECÇÃO DA AFLOTOXINA B1

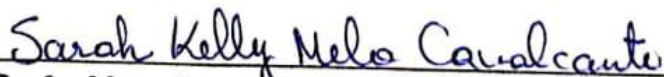
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Coordenação do Curso de Licenciatura em Quími-
ca do Instituto Federal de Alagoas - IFAL, como
requisito para obtenção do título de Licenciada em
Química.

Aprovado em 05 de Dezembro de 2019

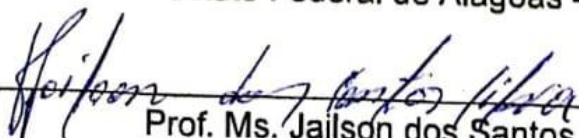
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima (Orientador)
Instituto Federal de Alagoas - IFAL



Profa. Msa. Sarah Kelly Melo Cavalcante (Examinadora)
Instituto Federal de Alagoas - IFAL



Prof. Ms. Jailson dos Santos Silva
Rede Estadual de Ensino de Alagoas

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a Deus, meu amigo, conselheiro, meu pai que sempre esteve e está comigo, me ajudando a compreender os mínimos detalhes da química, além disso sou eternamente grata por direcionar e iluminar o meu caminho.

Agradecimento especial a minha amada mãe, Lucidalva da Conceição e ao meu pai, Luiz Alves da Silva, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo oferecidos durante toda a minha vida, especialmente na acadêmica. Sou grata a toda a minha família que de alguma forma me ensinavam algo, em especial a minha sogra Dona Edneusa, que muitas vezes parava para ver meus ensaios de apresentação mesmo sem entender nada, mas estava ali para dar o maior apoio. Não poderia deixar de agradecer ao meu noivo, meu companheiro, meu amigo, meu confidente, meu eterno amor, muito obrigada por todo carinho, amor, paciência de também assistir minhas apresentações, de me ouvir quando estava bem sobrecarregada, obrigada por sua dedicação em todas as horas, principalmente nos momentos mais difíceis. Te amo!

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Phabyanno R. Lima é uma pessoa que de fato me instigou a lutar pelos meus sonhos, a não desistir, a pessoa que sempre tinha uma história para contar e que muitas vezes estava me ajudando mesmo sem perceber, o sr. me ensinou muito com sua humildade, professor Ph, você é um exemplo de professor que é muito raro de se encontrar. Agradeço muito também a Prof^a. Msc. Sarah Cavalcante Lima por acreditar em mim, pela paciência, dedicação, responsabilidade. A pessoa que era a minha confidente no laboratório, além da Nika, você me ouvia muito, me aconselhava e além de me orientar em apresentações e nos trabalhos, você se tornou uma amiga e vou sentir muitas saudades dos nossos papos de “mulherzinha” e ainda temos que ver os nossos golfinhos (nosso sonho secreto). Levarei os ensinamentos dos dois por toda minha vida.

Aos meus amigos do laboratório Mayrane, Walker, Diogo, Jailson, Henrique, Sara, Leticia, Nicholas, e principalmente a minha melhor amiga Nika (conhecida como Monik) muito obrigada minha parceira das loucuras por compartilhar comigo os melhores e os piores momentos de nossa vida, aprendi muito com você, foram muitas lágrimas mas a conquista chegou é tempo de comemorar! Muito obrigada a todos por toda sua paciência, amor e atenção, obrigada a todos que sempre me incentivaram, torceram por mim, obrigada pelas brincadeiras e pela amizade verdadeira.

Sou eternamente grata a todos os meus professor do curso de Licenciatura em Química que foram peças fundamentais para toda a minha formação, eu sinceramente não tenho palavras para expressar o quanto aprendi com cada um de vocês em especial o professor Jesu, Abel, Flávia, Ana Cristina, Lauro, Vitor, Ingrid, Anderson, Regina, Joacy, muito obrigada a todos pelos ensinamentos e discussões realizadas durante o curso.

Ao CNPq, FAPPEAL, CAPES e principalmente ao IFAL campus Maceió e Marechal pelo apoio financeiro e por disponibilizar laboratórios, possibilitando assim a realização desse trabalho.

A todos muito obrigado!

Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo.

(Provérbios 3:5,6)

RESUMO

No presente trabalho é descrito o desenvolvimento de um eletrodo que utiliza pela primeira vez o ácido xanturênico (AX) como sonda eletroquímica, através de um simples e eficiente eletrodo impresso de carbono modificado com nanomateriais, ativado com AX e imobilizado com aptamers para detecção da aflotoxina B1 (AFB1). A superfície sensora foi caracterizada por meio das técnicas voltamétricas como: voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria cíclica (VC), as quais foram utilizadas para estudar o comportamento dos eletrodos modificados, para a otimização dos parâmetros experimentais e obtenção dos parâmetros cinéticos, como estudo de velocidade e pH. A espécie eletroativa, quinona/hidroquinona, foi eletrogerada *in situ* no eletrodo modificado com nanomateriais e AX, após ciclos na faixa de potencial entre 0,5 e -1,0 vs. Ag na primeira varredura em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,5) com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Posteriormente ao processo de ativação, a faixa de potencial em torno do par redox quinona/ hidroquinona foi selecionada e os voltamogramas foram registrados em diferentes velocidades (5-20 mV s⁻¹), em seguida foi realizada imobilização de aptamer, aplicado com intuito de testar a atividade eletrocatalítica para oxidação da AFB1. Além disso, a espécie eletroativa gerada na superfície eletródica, apresentou inibição frente ao aptamer imobilizado ao reagir com AFB1, acarretando uma retenção de carga. Sendo assim, a partir dos resultados obtidos o aptasensor eletroquímico desenvolvido demonstrou-se uma alternativa promissora a ser aplicado em testes com amostras reais.

Palavras-chave: Sensor, Ácido xanturênico, Aptamers, Aflotoxina B1.

ABSTRACT

In the present work we describe the development of an electrode that uses xanturenic acid (AX) for the first time as an electrochemical probe, through a simple and efficient Aano-activated, nanomaterial modified carbon printed electrode immobilized with aptamers for the detection of aflotoxin. B1 (AFB1). The sensor surface was characterized by voltammetric techniques such as differential pulse voltammetry (VPD) and cyclic voltammetry (VC), which were used to study the behavior of modified electrodes, to optimize experimental parameters and obtain kinetic parameters. as a study of speed and pH. The electroactive species, quinone / hydroquinone, was electrogenerated in situ on the modified nanomaterials and AX electrode after cycles in the potential range between 0.5 and -1.0 vs. Ag at first sweep in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 5.5) with sweep rate of 50 mV s⁻¹. After the activation process, the potential range around the redox quinone / hydroquinone pair was selected and the voltammograms were recorded at different speeds (5-20 mV s⁻¹), then aptamer immobilization was performed, applied with the intention of to test the electrocatalytic activity for AFB1 oxidation. In addition, the electroactive species generated on the electrode surface showed inhibition against the immobilized aptamer when reacting with AFB1, causing a charge retention. Thus, from the results obtained the electrochemical aptensor developed showed a promising alternative to be applied in tests with real samples.

Key-words: Sensor, Xanturenic Acid, Aptamers, Aflotoxin B1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.	19
Figura 2: Mecanismo de ação da aflatoxina B1.	19
Figura 3: Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.....	21
Figura 4: Biossíntese do ácido xanturênico, com suas respectivas enzimas: TD (Triptofano dioxigenase), QF (Quinurenina Formidase), QAT (Quinurenina aminotransferase), Q3H (Quinurenina 3-hidroxilase) e TA (Transferaminase).....	27
Figura 5: Métodos Eletroquímicos.	30
Figura 6: Esquema de uma VPD	32
Figura 7: Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica (A). Voltamograma cíclico para um sistema reversível (B).	33
Figura 8: Esquema da modificação do eletrodo de carbono.....	36
Figura 9: Adição e polimerização do AX no eletrodo.....	37
Figura 10: Adição de NHS/EDC e imobilização de APTAMER.....	37
Figura 11: Adição da aflotoxina B1.	38
Figura 12: Potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Echo Chemie.	39
Figura 13: Célula eletroquímica para eletrodos impressos.....	39
Figura 14: Eletrodo impresso de carbono com os três eletrodos: Trabalho (WE), referência (RE) e contra eletrodo (CE).....	40
Figura 15: (A) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ MWCNT-COOH. AX 120 uM em PBS 0.1 mol/L, pH 5.5 e $v = 50\text{mV s}^{-1}$, 15 ciclos. (B) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ MWCNT. (C) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ Nanofitas. (D) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/rGO. (E) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ não modificado.....	41
Figura 16: Estruturas do possível produto de oxidação e dímeros do XA.	43
Figura 17: Sucessivos voltamogramas (A) PolyAX /MWCNT-COOH/ SPE; (B) PolyAX/MWCNT/SPE;.....	44
Figura 18: Sucessivos voltamogramas de SPE / MWCNT-COOH/ PolyAX em diferentes faixas de varredura (5mVs^{-1} a 20mVs^{-1}).....	45
Figura 19: Efeito do pH no comportamento redox do PolyAX/ MWCNT-COOH/ SPE, voltamogramas obtidos em tampão fosfato $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ e $\square\square = 50\text{ mV.s}^{-1}$	46

Figura 20: Sucessivos Voltamogramas cíclicos de SPE / MWCNT-COOH/ PolyAX em PBS 0,1 mol / L, pH 7,0 e $v = 20\text{mVs}^{-1}$ na presença de APT 100pM (linha vermelha) e ausência APT (linha preta).....	47
Figura 21: (A) Sucessivos voltamogramas cíclicos de APT / PolyAX / MWCNT-COOH/ SPE em PBS 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,0 e $v = 20\text{mVs}^{-1}$ na presença de AFB1 0,83 mM (linha vermelha) e ausência AFB1 (linha preta). (B) Sucessivos voltamogramas cíclicos AFB1/APT/ PolyAX / MWCNT-COOH/ SPE.	48
Figura 22: (A). VPD de APT / PolyAX /MWCNT-COOH/ SPE, na presença de 0,83 mM de AFB1 (linha vermelha) e ausência de AFB1 (linha preta), (B) VPD de APT/ PolyAX / MWCNT-COOH/ SPE em PBS 0,1 mol / L, pH 7,0 e $v = 20\text{mVs}^{-1}$	49

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Reagentes utilizados durante o processo de construção dos sensores químicos.35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1. Micotoxinas.....	17
2.1.1. Aflatoxina	17
2.2. SENSORES QUÍMICOS.....	20
2.3. ELETRODOS QUÍMICAMENTE MODIFICADOS (EQM).....	22
2.3.1. Nanomateriais (NMs) de Carbono.....	24
2.3.2. Ácido Xanturênico.....	26
2.3.3. Aptâmeros (APT)	28
2.4. MÉTODOS ELETROQUÍMICOS	29
2.4.1. Voltametria de Pulso	31
2.4.2. Voltametria Cíclica	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Geral.....	34
3.2. Específico	34
4. EXPERIMENTAL	35
4.1. Materiais e Reagentes	35
4.2. Modificação do Eletrodo impresso de Carbono	35
4.3. Ativação do SPE/Nanomateriais com o Ácido Xanturênico (AX).....	36
4.4. Imobilização do APTAMER e aplicação da AFB1	37
4.5. Equipamentos	38
4.5.1. Medidas eletroquímica.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1. Caracterização eletroquímica: Adição e polimerização do AX no eletrodo.....	41
5.2. Estudo do efeito da velocidade de varredura de potenciais	45

5.3. O efeito do pH no comportamento redox do eletrodo modificado	46
5.4. Estudo da eletrooxidação da AFB1	47
6. CONCLUSÃO	50
7. PERSPECTIVAS	51
8. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos países líderes na produção de alimentos agrícolas e de commodities, bem como possui ótimas condições para o desenvolvimento de fungos micotoxigênicos (PEREIRA, K. C. et al, 2011). Sendo assim, existem fungos que encontram condições favoráveis ao seu crescimento em todo processo da produção agrícola, desde o cultivo e colheita ao transporte e armazenamento, resultando em efeitos prejudiciais sobre a saúde humana e animal, sendo capazes de induzirem efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos.

A crescente preocupação dos países importadores quanto à presença de micotoxinas nos alimentos tem levado à elaboração de legislações cada vez mais rígidas no que concerne aos níveis máximos permitidos. O Brasil, a exemplo de outros celeiros mundiais, deverá enfrentar em breve, dificuldades cada vez maiores para exportar seus produtos agrícolas. Estudos conduzidos no país têm comprovado que muitos alimentos, rações e ingredientes apresentam níveis muitas vezes superior ao permitido pela legislação brasileira e internacional (ANVISA, 2011; EMBRAPA DOCUMENTOS 110, 2017). Estimativas da FAO calculam que as perdas mundiais com a contaminação de alimentos por micotoxinas situam-se ao redor de 25% de toda a produção. Estas estimativas são teóricas porque não existe um país que mantenha um controle total sobre a qualidade dos alimentos que produz e nem avalie o valor de suas perdas (FRIZZARIN, A. et al, 2012).

Entre as micotoxinas, o grupo mais relevante são as aflatoxinas, produtos carcinogênicos pertencentes às espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*. Foram identificados quatro tipos de aflatoxinas: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, mais dois metabolitos adicionais: AFM1 e AFM2, sendo AFB1 classificado como o mais abundante e perigoso (CASTILLO,G. et al, 2015). A toxicidade das aflatoxinas é devida a uma ligação dupla no seu anel, considerado o centro ativo da molécula, e responsável pela sua fluorescência. No ser humano, a aflatoxina B1 (AFB1) é rapidamente absorvida pelo sistema gastrointestinal, o que facilita a sua circulação na corrente sanguínea (ANDRADE, A. V., 2017). Vê-se então a necessidade de monitorar tal composto.

Vários métodos tradicionais foram desenvolvidos para detecção e quantificação de micotoxinas, tais como a técnica de ELISA (ROSSETO, R. L. et al, 2013; RODRÍGUEZ, C. Y. et al, 2014) ; cultura microbiológica; testes de identificação microscópica ou cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia

gasosa/espectrometria de massas (CG-MS). Porém, várias desvantagens podem ser apontadas, como: não determinam se os fungos encontrados podem ou não produzir micotoxinas, tempo de análise relativamente alto; apenas detecta uma micotoxina de cada vez e normalmente são necessários testes adicionais para confirmar sua presença, alta incidência de resultados falso-positivos, relativamente caro em relação a outros métodos de análise e necessidade de testes adicionais para confirmação (LATTANZIO, V. M.T. et al, 2009; YU, C. et al, 2010; ANDRADE, P. D. et al, 2013) levando à inviabilidade de investimento do ponto de vista operacional e prático.

Todavia, os métodos eletroquímicos têm recebido atenção considerável devido à vantagem de resposta rápida, instrumentação barata, operação simples, economia de tempo, alta sensibilidade e seletividade, detecção em tempo real devido a condição *in situ* (YIN *et al.*, 2010). Por outro lado, os métodos eletroquímicos apresentam uma série de inconvenientes, e estes podem estar atrelados à fase sensora dos dispositivos eletroquímicos. Neste sentido, a modificação estratégica da interface tem sido o foco de muitos trabalhos reportados por vários grupos de pesquisa ao longo de décadas (LIMA *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura, uma alternativa para a modificação da fase sensora, têm-se a construção de biosensores com a utilização de aptamers, os polímeros impressos molecularmente, adsorção de materiais, entre outros. Estes sensores apresentam vasta aplicação nas indústrias de alimentos (ZHENG *et al*, 2006) e bioprocessos, no qual o monitoramento em tempo real é muito valioso, ou ainda em aplicações ambientais (DIAS, A. D. *et al*, 2014) onde, tanto a indústria quanto os órgãos de vigilância ambiental, necessitam de sensores para análise quantitativa ou diferencial de inúmeros despojos industriais.

Sendo assim, o cerne do presente trabalho é estudar alternativas para evitar inconvenientes, como, a passivação gradual da interface que impacta diretamente no desempenho dos sistemas desenvolvidos. Assim, esta pesquisa faz uso de materiais simples e inovadores, destacando-se os processos de construção de biosensores com a imobilização de aptamers, sensores impressos de carbono, utilização de nanomateriais e ácido xanturênico como mediador para a transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

Desta forma é possível pré estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar o limite de detecção e de quantificação do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos vantajosos de fácil operação, baixo custo, susceptíveis à miniaturização com possibilidade de portabilidade, agregando, portanto, viabilidade de investimento tanto do ponto de vista de produção em escala industrial quanto no que diz respeito à aplicabilidade em análises de campo.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Micotoxinas

O termo micotoxina é derivado da palavra grega *Mykes* que significa fungo e *Toxicum* que significa veneno ou toxina (SANTOS, M.C. et al, 2014). Sabe-se que, as micotoxinas são metabólitos secundários, biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas, não essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo com variado grau de toxicidade que podem apresentar propriedades específicas e causar alterações patológicas ou funcionais. Entre os gêneros fúngicos envolvidos na produção de micotoxinas destacam-se: *aspergillus sp*, *penicilium sp* e *fusarium sp*. As espécies de *aspergillus sp* e *penicillium sp* costumam contaminar alimentos durante a secagem e o armazenamento, enquanto que as espécies de *fusarium sp* contaminam as plantas antes ou depois da colheita (HERMANNNS, G. ET AL, 2006).

Pesquisas revelam os efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos e/ou carcinogênicos das micotoxinas em humanos e animais, pela ingestão de alimentos contaminados, como os grãos de cereais (milho, trigo, cevada, arroz, aveia dentre outros), as frutas (uva, cacau, café e maçã) e sementes oleaginosas (amendoim, castanha do Brasil e nozes). Os alimentos contaminados por fungos filamentosos, ao serem ingeridos, permitem que os metabólitos gerados pelo fungo invadam tecidos ou fluidos do hospedeiro, causando um serie de danos para a saúde pública e animal.

A contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto (BITTENCOURT, C.A.F, et al, 2003) pois as micotoxinas são produzidas em ambientes adequados, sobre substratos apropriados e por linhagens fúngicas específicas (ICB, 2014). As aflatoxinas, por exemplo, são micotoxinas produzidas por linhagens de fungos do gênero *aspergillus sp*, as quais naturalmente podem se desenvolver em alimentos. Essas micotoxinas têm sido detectadas em sementes de culturas com importância mundial como: amendoim, milho, sementes de algodão, nozes, amêndoas, figos, pistaches, especiarias, leite, queijo, frutas e em uma variedade de outros alimentos e bebidas.

2.1.1. Aflatoxina

As aflatoxinas possuem toxicidade aguda e crônica, devido a capacidade de ligar-se a ácidos nucleicos e nucleoproteínas celulares, resultando em efeitos deletérios sobre a síntese de proteína na célula. Todas as aflatoxinas produzem efeitos diversos e a aflatoxinas B1 (AFB1)

exprime maior toxicidade, considerada a mais carcinogénica de acordo com a Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (IARC), seguida pelas aflatoxinas G1, B2 e G2. A ingestão de AFB1 por humanos e animais podem causar hepatite tóxica, hemorragia, edema, imunocupressão, carcinoma hepático e conseqüentemente morte (NAKAI, V. K et al, 2008; IDRIS, Y. M. A et al, 2010).

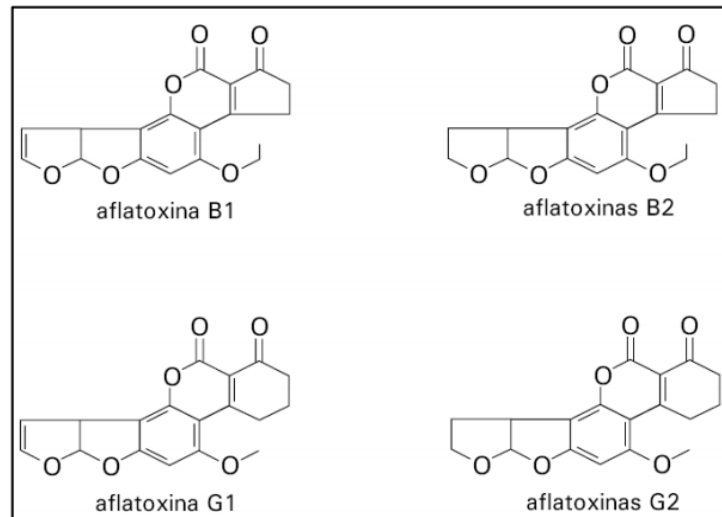
As aflatoxinas B1 e B2 são produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*, e as aflatoxinas G1 e G2 produzidas por *A. parasiticus* (RODRIGUES,P. et al. 2009). Recentemente a espécie *A. nomius* também se tem mostrado produtora de aflatoxinas B1 e B2 (PERERSON, S.W et al. 2001). Em condições ambientais adequadas a produção das aflatoxinas nos alimentos é rápida, nomeadamente em condições de chuva e orvalho em períodos quentes. Desta forma, podem ser encontradas em alimentos de regiões com temperatura e humidade elevadas (JAY, J. 1997).

Ademais de acordo com a legislação brasileira, através da resolução RDC Nº 7, dispostas no portal da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para aflatoxina b1 em alimentos para consumo humano, como amendoim, nozes e amêndoas podem ter LMT variando de 5 a 10 µg/kg. Dado ser praticamente impossível a eliminação total das aflatoxinas nos alimentos, é necessário as precauções adequadas, procurando reduzir ao máximo os níveis de aflatoxina nos alimentos humanos e do gado, visto que a mesma pode trazer uma serie de problemas a saúde humana e animal.

Dados epidemiológicos implicam o AFB1 como um componente do câncer de fígado em humanos em certas partes do mundo (PERRONE, G. et al., 2017). Quando o AFB1 é ingerido, é biodegradado no fígado pelo sistema enzimático do citocromo P450. Posteriormente, o AFB1 pode se ligar a macromoléculas celulares, incluindo o material genético (proteínas e DNA), formando adutos com ácidos nucléicos. Esses adutos se tornam um anel aberto estável derivado da formamidopiridina e o reparo dessas lesões leva ao aparecimento de câncer e mutações genéticas. (CAMPAGNOLLO, F. B. et al., 2016).

A estrutura química deste grupo é caracterizada pela ligação de dihidrofurano ou tetrahydrofurano a uma estrutura cumarínica (KAWASHIMA,L.M., 2004). A seguinte imagem apresenta as fórmulas químicas das principais aflatoxinas (Fig. 1), com base na fluorescência delas sob luz ultravioleta (B=Blue, G=Green) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada.

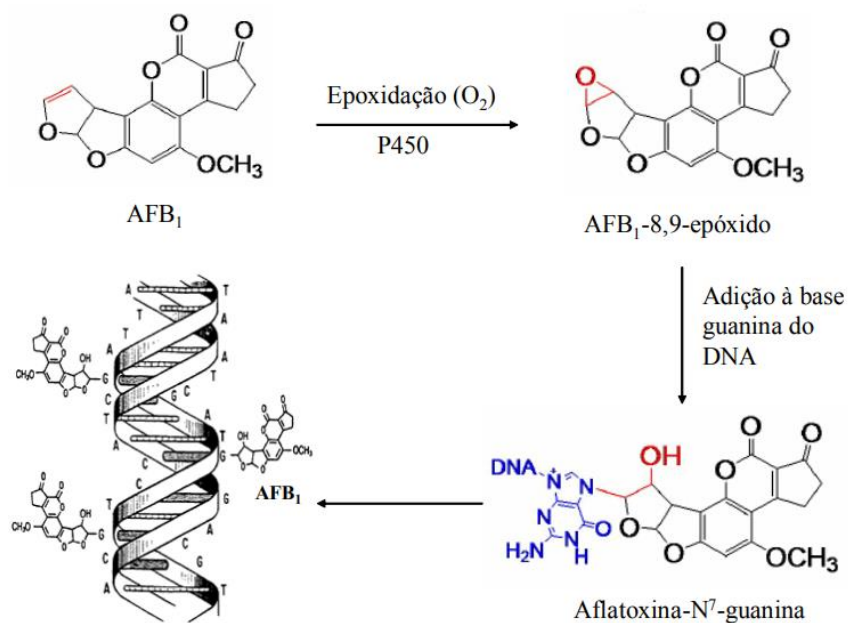
Figura 1: Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.



Autor: SCUSSEL, V. M., 1998.

O metabólito mais importante é a aflatoxina B1 (AFB1), devido à sua elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos. A forma ativada da AFB1 é o composto identificado como 8,9-epóxido de AFB1, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de AFB1 (Fig. 2) (UFSC, 2010).

Figura 2: Mecanismo de ação da aflatoxina B1.



Autor: HAYASHI, 2007

Este composto é altamente eletrofílico e capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. A ligação da AFB1-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB1 (UFSC, 2010).

Inúmeros métodos para determinação de aflatoxinas tem sido desenvolvidos, sendo assim, como foi supracitado, as técnicas de detecção eletroquímica têm recebido considerável atenção, visto que o campo da eletroquímica está centralizada na transferência de elétrons, particularmente, nos processos relacionados à interface eletrodo/solução e desempenha papéis relevantes em várias áreas, sejam elas fundamentais e/ou aplicadas. Com isso, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos vem aumentando, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, o qual tem levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como precisão, rapidez na resposta, alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (CIOBANU et al., 2007; WONG, 2010).

2.2. SENSORES QUÍMICOS

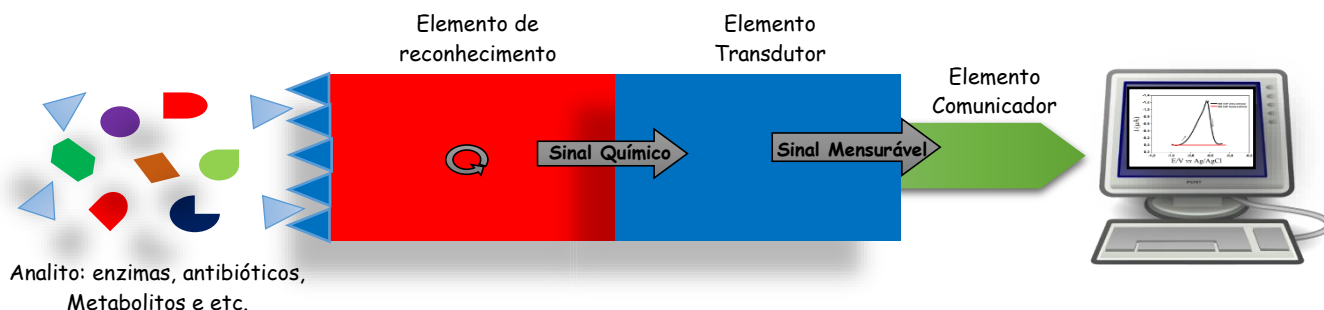
Os sensores químicos são dispositivos que tem por objetivo detectar a presença de uma ou várias espécies químicas, frequentemente presentes em amostras complexas, capazes de transformar informações químicas em um sinal analiticamente útil. De forma geral, os sensores são ordenados em duas classes:

- 1- Sensores físicos: Dispositivos usados para medir quantidades de força, pressão, temperatura, velocidade e muitos outros (BANICA, 2012).
- 2- Sensores químicos: Dispositivos usados para detectar substâncias empregando um elemento receptor químico, que engloba biossensores, os quais utilizam um receptor biológico como forma de identificação de substâncias (CAPELETTI, 2010).

Os sensores químicos podem reconhecer um ou mais analitos por meio de uma reação química na interface sensor-amostra, podendo ser aplicado para amostras de origem biológica ou não (CAPELETTI, 2010). Na figura 3 é possível observar um modelo esquemático dos

principais componentes de um sensor químico, mostrando o caminho desde a interação do analito com a fase sensora até a obtenção da resposta tanto qualitativa quanto quantitativa.

Figura 3: Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa, 2019.

Neste modelo esquemático é apresentado o elemento de reconhecimento, o transdutor e o comunicador. Na parte de reconhecimento de um sensor, é onde ocorre a interação de forma específica com o analito, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico-químicos e assim é possível obter uma informação química, a qual, é transformada numa forma de energia gerando uma variação de sinal, que pode ser medido pelo transdutor. O transdutor é responsável por converter o sinal gerado que transporta a informação química sobre a amostra, num sinal analiticamente mensurável e a parte do comunicador é responsável por transportar o sinal analítico ao equipamento.

Os sensores químicos possuem alguns aspectos que os fazem ser bastante requerido em análises químicas, como também podem fazer com que o sensor em questão não seja suficiente para tais processos, caracteristicamente, o sensor deve obedecer alguns requisitos importantes para fins comerciais, como : Sensibilidade, reprodutibilidade, de baixo custo, com resposta rápida, de fácil fabricação e estável (LIU, 1995). Todos estes fatores supracitados são levados em consideração na criação de um sensor químico, todavia temos também a especificidade, que é uma das questões mais importantes na detecção química. Ela determina a utilidade do sensor para qualquer aplicação. Pode ser definida como a capacidade de um sensor para responder principalmente a apenas uma espécie (analito) na presença de outras espécies. Existem classes gerais de seletividade: baseada no equilíbrio e baseada na cinética. Ambos os tipos dependem de interações específicas da molécula do analito com a camada seletiva (JANATA et al., 2009).

Existem milhões de espécies químicas, portanto a seletividade é de primordial importância; a aquisição de "sinais falsos" e/ou sua interpretação errada poderia ser desastroso. Neste contexto, percebe-se que apesar das vantagens que os sensores podem promover, existem algumas desvantagens como a falta de seletividade em sistemas complexos, além de passivação gradual da superfície do eletrodo por adsorção, necessidade de aplicar sobretensões para oxidação ou redução da espécie em estudo, são evidenciadas de certas inconveniências eletrodos são utilizados individualmente (FREIRE et al, 2003).

Uma das estratégias para evitar tais problemas no tocante à seletividade é envolver o reconhecimento de uma espécie química levando-se em consideração sua forma, isto é, estereoespecificidade (HAUPT et al., 2011). Dessa forma, uma área que tem crescido significativamente com potencial para minimizar as desvantagens apresentadas acima, é a dos eletrodos quimicamente modificados (EQM), os quais, constituem um sistema de eletrodos relativamente moderno que pode ser utilizado em amplos campos da investigação eletroquímica.

2.3. ELETRODOS QUÍMICAMENTE MODIFICADOS (EQM)

As superfícies dos eletrodos são modificadas na tentativa de tornar possível uma função eletroquímica impraticável ou difícil de se realizar usando eletrodos convencionais (EDWARDS G. A. et al, 2007). Os pioneiros dessa engenharia são Lane, Hubbard, Murray e Miller. Há mais de quatro décadas, uma extensa pesquisa foi dedicada ao projeto de diversas formas de materiais de eletrodo, envolvendo um importante desenvolvimento nesta área. Assim, o uso desses eletrodos quimicamente modificados como ferramentas para síntese, análise, eletrocatalise e detecção de biomoléculas mostrou-se atrativo e muito interessante (OURARI et al., 2015).

Em particular, um eletrodo quimicamente modificado é um material condutor ou semicondutor, revestido com um filme monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico, que modifica as propriedades eletroquímicas da interface. Os substratos condutores e semicondutores são derivados de materiais de eletrodos convencionais e podem ser fabricados comercialmente ou no próprio laboratório, alguns materiais são mais convenientes para modificação, como Au, Pt, Ag, eletrodo de carbono e nanofibras de carbono, enquanto que os modificadores são amplamente diversificados em suas origens e propriedades. (EDWARDS, A. et al, 2007).

A modificação da superfície do eletrodo melhora o desempenho de um eletrodo como um dispositivo, sensor, de várias formas (SHARMA et al., 2018):

- A modificação química limita o acesso à interferência e fornece melhor seletividade para a molécula alvo, como resultado de interações específicas do material de modificação com a molécula alvo.
- O material de modificação atua como um mediador rápido na transferência de elétrons entre a molécula alvo e o eletrodo que induz a rápida oxidação ou redução do alvo. Isso resulta em um deslocamento para menores potenciais que acarreta na diminuição de energia, que por sua vez, permite um melhor pico de separação entre diferentes analitos.
- Melhor sensibilidade é observada com os materiais de revestimento tendo grande área superficial devido a atividades eletrocatalíticas melhoradas.
- Leva a rápida difusão e pré-concentração da molécula alvo na superfície do eletrodo.
- Reduz o efeito de incrustação.

Assim é possível construir eletrodos para diversos propósitos e aplicações, tais como: conversão e armazenamento de energia solar, síntese eletro-orgânica seletiva, “displays”, dispositivos, proteção à corrosão e eletroanálise. A possibilidade de manipular a arquitetura molecular da matriz de um eletrodo e em particular de sua superfície tem gerado uma ampla gama de aplicações analíticas dos EQMs e criado uma nova visão para a eletroanálise (RADI, 2010).

Outro ponto importante nos EQM refere-se ao método de fixação dos modificadores na superfície do eletrodo, pois além dos substratos terem que apresentar características eletroquímicas apropriadas, devem ser adequados para o método de imobilização a ser utilizado, sendo assim, os métodos de modificação são geralmente agrupados em quatro categorias principais: adsorção (SOUZA, 1997), ligação covalente (SOUZA, 1997), aprisionamento/encapsulação (CAPELETTI et al., 2019), polimerização/filmes Poliméricosa (TARLEY, C. R. T. et al, 2005), a escolha dependerá do método de modificação selecionado para a construção do sensor, desde sua base técnica de imobilização até a identificação do analito em estudo.

Por esta razão, entre os materiais utilizados para a construção do sensor, os nanomateriais de carbono vem recebendo notoriedade e sendo continuamente descritos na literatura devido às suas propriedades físico-químicas e variações na condutividade, em função

da adsorção de moléculas alvo facilmente detectáveis, gerando sensores com baixo limite de detecção e alta sensibilidade. (HERBST, M. H et al, 2004)

2.3.1. Nanomateriais (NMs) de Carbono

Dentre os novos materiais desenvolvidos, devido ao avanço da nanociência e nanotecnologia, os nanomateriais (NMs) de carbono merecem destaque por serem considerados versáteis, não tóxicos, garantindo baixo risco no manuseio e armazenagem, além da própria riqueza e diversidade do carbono. A Comissão Europeia emitiu em 2011 uma recomendação sobre a definição de NMs, definindo os nanomateriais como um material natural ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou em forma de agregado/aglomerado e em cuja distribuição número-tamanho 50% ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nanómetro e 100 nanómetros. (COMISSÃO EUROPEIA,2011; LOURO, H. et al, 2013; GIGAULT, J. et al, 2018)

Os NMs por apresentarem características únicas e atrativas, conseguem aplicar-se a inúmeras áreas podendo ser preparados e sintetizados por vários métodos como: biossensores, biossensores óticos, fluorescência e dentre outros. Ademais, apresentam diversas utilidades e aplicações na área farmacêutica, sobretudo na detecção e diagnóstico de vários alvos, como macromoléculas (proteínas, DNA e RNA), vírus (a exemplo do VIH), e células bacterianas. Outras aplicações desses nanomateriais é no setor de cosméticos, indústria alimentar, eletrônica, engenharia de máquinas, indústria de construção ou no campo ambiental. (VALIZADEH, A., 2015; VALIZADEH, A. et al, 2017; PROKOPEC, V. et al, 2018)

Devido à reduzida dimensão das partículas e às modificações que ocorrem ao nível da estrutura destes materiais, conduzindo ao aumento da área superficial em relação ao volume, isto é, ao aumento do número de moléculas/átomos, conseguem alcançar propriedades de únicas na superfície, comparativamente aos materiais com as mesmas composições físico-químicas, mas de maiores dimensões. Isso permite-lhes modificar a reatividade e melhorar as suas propriedades no campo ótico, eletroquímico e mecânico. Devido à descoberta destes tipos de propriedades, têm evidenciado um crescimento e evolução significativos na sua utilização ao longo dos últimos anos. (VALIZADEH, A., 2015; VALIZADEH, A. et al, 2017; PROKOPEC, V. et al, 2018)

Ademais, desde a primeira aplicação dos NMs em eletroquímica por Britto et al., (1996), numerosos grupos de pesquisa trabalharam com a construção de sensores

eletroquímicos utilizando esses nanomateriais, os quais, possibilitam a imobilização de mediadores orgânicos, inorgânicos, biológicos e também por processos de polimerização em eletrodos modificados. O uso dos mediadores redox e NMs em uma matriz pode gerar sinergia em termos de melhorar o desempenho do sensor e também oferecem formas mais eficientes de comunicação entre os eletrodos dos sensores e os sítios redox ativos de moléculas biológicas (DUMITRESCU, I. et al, 2009).

A função de um mediador redox é intermediar a transferência de elétrons entre o eletrodo e a espécie de interesse, onde a reação eletroquímica ocorre sem que ele próprio participe da reação. Este tipo de troca indireta de elétrons entre o substrato e o eletrodo é referida como transferência eletrônica mediada (MASA, J. et al, 2016).

As características mais importantes, que são essenciais para a função de mediadores redox são **(i)** taxa de transferência de elétrons rápida, tanto com o substrato de interesse quanto à superfície do eletrodo, **(ii)** potencial redox baixo, a fim de evitar co-oxidação ou co-redução de compostos interferentes, **(iii)** estabilidade química suficiente da forma oxidada e reduzida, e **(iv)** baixa energia de reorganização para permitir a rápida transferência de elétrons mesmo sobre distâncias significativas de transferência de elétrons (RATHEE, K. et al., 2016).

Nessa perspectiva, o processo de imobilização de mediadores tem um papel fundamental nas características dos sensores e biossensores. Uma das justificativas diz respeito à orientação e à proximidade das moléculas do mediador à superfície eletródica, podendo favorecer na transferência de elétrons. A imobilização deve ser realizada de tal forma que o mediador esteja em contato direto com o eletrodo, mantendo sua atividade, proporcionando a livre difusão de substratos e produtos na camada biocatalítica (Assis, F., 2009). Problemas como a oxidação de substâncias interferentes e envenenamento do eletrodo são objeções comumente observadas em alguns eletrodos, devido à necessidade de aplicação de potenciais elevados.

Neste contexto, uma das estratégias usadas para diminuir o potencial aplicado foi a utilização de mediadores redox imobilizados sobre a superfície do eletrodo, visto que, os nanomateriais permitem a imobilização de mediadores tanto de origem biológica, quanto inorgânica, orgânica ou por processo de polimerização em eletrodos modificados. Vários materiais estão sendo explorados para o desenvolvimento de novas interfaces e entre estas interfaces, destaca-se a aplicação de compostos fenólicos. Fenóis são uma classe de substâncias químicas constituídas por hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático. Na eletrooxidação do fenol e seus derivados, são gerados radicais fenoxila, que podem ser oxidados ou acoplados,

formando compostos oligoméricos ou poliméricos com funções éter e quinona, (EŽERSKIS, Z. et al, 2001).

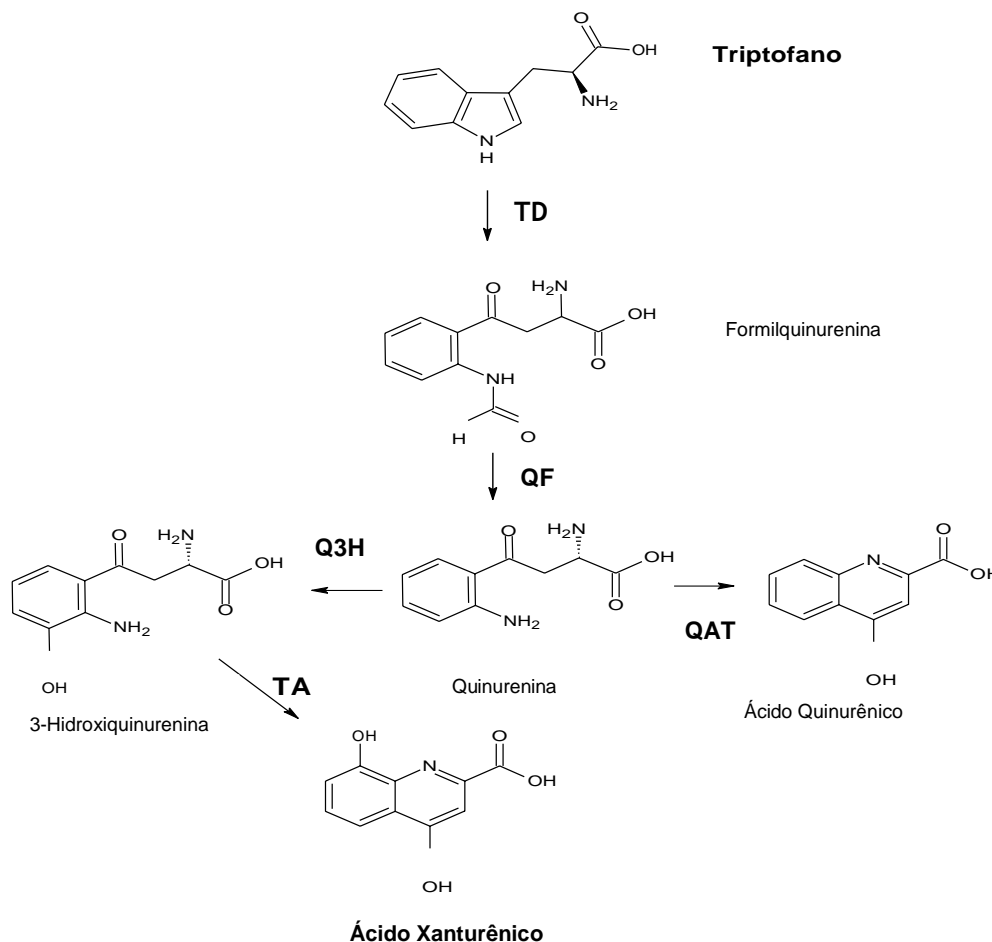
Diferentes classes de compostos fenólicos estão presentes na literatura e são utilizados como mediadores redox para análise de compostos de relevância biológica, dentre eles o ácido Xanturênico (AX), 4,8-diidroxiquinolina-2-ácido carboxílico, vem recebendo notoriedade, pois é um antioxidante que está presente em alguns seres vivos, caracterizado pela presença do grupo fenólico em sua estrutura, sendo portanto um composto versátil, polifuncional com atenção especial ao grupo hidroxila, o qual pode facilitar o processo de transferência de elétrons e ainda pode ser ativado eletroquimicamente *in situ*, por meio da oxidação irreversível da hidroxila fenólica.

2.3.2. Ácido Xanturênico

O ácido xanturênico (AX) é um metabólito da rota de oxidação do triptofano e sua formação a partir do triptofano é um processo que envolve um grande número de enzimas na rota bioquímica. Um grande número de trabalhos tem mostrado que a concentração de triptofano pode estar associada com o estresse oxidativo e o AX com os estágios patogênicos da diabetes (ROGER e MOHAN, 1994) e de catarata em idosos (MALINA, 1999). O AX possui conhecidas propriedades antioxidantes, formando quelatos com vários metais, especialmente com ferro (MURAKAMI, HANEDA e YOSHINO, 2006).

O processo completo para a formação do ácido xanturênico, de modo geral, consiste na oxidação triptofano à formilquinurenina, hidrólise da formilquinurenina à quinurenina, hidroxilação da quinurenina à 3-hidroxiquinurenina, transaminação da 3-hidroxiquinurenina a um intermediário ceto-ácido na cadeia lateral e ciclização do intermediário, levando à formação do ácido xanturênico (Figura 4) (HAN et al., 2007).

Figura 4: Biossíntese do ácido xanturênico, com suas respectivas enzimas: TD (Triptofano dioxigenase), QF (Quinurenina Formidase), QAT (Quinurenina aminotransferase), Q3H (Quinurenina 3-hidroxilase) e TA (Transferaminase).



Fonte: HAN, 2007

No trabalho realizado por MURAKAMI e colaboradores (2006) foi comprovado que o AX pode atuar como um prooxidante pela formação de um complexo quelato redox-ativo. Além disso, uma das razões para selecionar o ácido xanturênico diz respeito aos grupos fenólicos presente em sua estrutura, os quais são passíveis de sofrerem oxidação e subsequentemente reações de polimerizações gerando assim, dímeros e filmes poliméricos altamente estáveis e com propriedades eletroativas, imprescindíveis para sua utilização como mediador redox (ASSIS, F., 2009).

Vários componentes biológicos apresentam-se como bio-componentes potenciais a serem usados em sistemas de sensores químicos, entre eles: Enzimas (CHAMBERS et al, 2008); Receptores (CHAMBERS et al, 2008); Ácido Nucléicos e Aptâmeros (RAVERA et al, 2007). A maioria dos sensores de DNA é desenvolvida com base na imobilização de uma sonda feita a partir de uma fita simples de DNA (ssDNA) na superfície de um eletrodo marcada com

um indicador eletroquímico que reconhece sua sequência-alvo complementar (WANG, 2000; AHAMMAD et al, 2009). Recentemente, os aptâmeros têm recebido grande atenção como componente de reconhecimento em biossensores (HAN et al, 2010).

2.3.3. Aptamers (APT)

Um avanço importante na pesquisa e desenvolvimento de biossensores tem sido a produção de aptamers, ou seja, oligonucleotídeos de alta especificidade para ligação a uma molécula alvo de interesse, produzidos *in vitro* por um processo chamado SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial). Esses pequenos fragmentos de cadeia simples de ácido nucléico (DNA ou RNA) aumentam a imobilização e promovem uma maior seletividade já que eles mantêm a especificidade biológica desejada, além de serem menores e mais simétricos do que os anticorpos convencionais (PRAKASH JS. et al, 2015) ligando-se a seus alvos com alta afinidade e especificidade, semelhantemente ao anticorpo, para reconhecimento molecular (BALA J. et al, 2018).

Os oligonucleotídeos tem estruturas lineares sintéticos, geralmente com 15 a 40 nucleotídeos de extensão, submetidos a muitas interações intramoleculares, as quais dobram a cadeia oligonucleotídica (BELLUZO et al, 2008) fazendo-a adquirir uma conformação tridimensional bem definida e tornando-a capaz de se ligar ao seu alvo com alta afinidade e especificidade (ZHU et al, 2006). As moléculas-alvo variam desde pequenas moléculas orgânicas, íons metálicos, proteínas, microrganismos e de células biológicas a estruturas teciduais (PRAKASH JS. et al, 2015 ;ZHANG X. et al, 2016; CATALDO R. et al, 2018). As elevadas especificidade e afinidade possibilitam que o aptamer se ligue apenas à molécula alvo de interesse para a qual foi projetado com facilidade e rapidez, sem qualquer interferência no sistema imunológico, tornando-o uma opção interessante para o diagnóstico e tratamento de doenças (Lu Y. et al, 2010; Wang C. et al, 2015). Eles ainda podem ser utilizados para analisar o processo natural de reconhecimento de ácidos nucléicos-proteínas, para gerar inibidores de enzimas, hormônios e toxinas com potencial uso farmacológico, exibindo características únicas sobre os antibióticos (VOROBYEVA M. et al, 2016; WANG L . et al, 2018).

O interesse em se utilizar aptamers como agentes ligantes específicos a uma molécula-alvo para aplicações em diagnóstico e tratamento de doenças se deve a sua relativa facilidade de obtenção, sem necessidade de uma modelagem estrutural dos sítios receptores para a seleção *in vitro* em larga escala. Os aptamers podem ser quimicamente caracterizado facilitando sua

incorporação em dispositivos de biossensores para uso em uma ampla gama de aplicações. Um típico sensor eletroquímico baseado em aptamers (aptasensor), faz uso de uma superfície de eletrodo como plataforma de imobilização na qual o evento de ligação do analito é monitorado com base nas variações eletroquímicas obtidas a partir de indicadores redox. Mesclando a versatilidade de nanomateriais e aptamers (CASTILLO,G. et al, 2015).

Dessa forma, com a utilização destas monocamadas (nanomateriais, AX, aptamer e o analito – (AFB1)) aplicadas na superfície do eletrodo, as mesmas, podem ser caracterizadas por diferentes técnicas para analisar a eficiência de cada modificação inserida na fase sensora. Embora a literatura registre muitos trabalhos envolvendo métodos baseados em algumas técnicas tradicionais, como já foi supracitado, as mesmas, trazem alguns inconvenientes, estimulando a busca de métodos alternativos, como os métodos eletroquímicos que têm sido bastante difundidos para determinação de vários compostos, devido a sua sensibilidade, seletividade, simplicidade, custo moderado, rapidez na análise e ainda a possibilidade de serem automatizados para projetar um dispositivo portátil.

2.4.MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

Os estudos sobre a Eletroquímica tiveram seu início na Itália, ao final do século XVIII (1791), quando Luigi Galvani (1737–1798) dessecava uma rã e, acidentalmente, percebeu que ao tocar com certas lâminas metálicas as terminações nervosas, os seus músculos se contraíam; tal observação foi umas das principais evidências, e ponto de partida, para os estudos que culminaram na descoberta e definição de corrente elétrica (TICIANELLI, 1998).

Todavia, em 1800 um cientista chamado Alessandro Volta descobriu que ao unir placas de zinco e prata (eletrodos) por uma pasta e mergulhá-las em uma solução salina, observa-se um fluxo de energia. Se o impacto da invenção de Volta no mundo científico foi ótimo, entre as pessoas comuns foi uma imensa descoberta. A novidade era demasiadamente chocante para ser esquecida, hoje se diz que foi uma "inovação científica" (TRASATTI,1999).

Em contraste com muitas medições químicas, os processos eletroquímicos ocorrem na interface eletrodo-solução. De todos os métodos disponíveis para o estudo dos processos de eletrodos, os métodos de varredura em potencial são provavelmente os mais amplamente utilizados, particularmente por não-eletroquímicos (WANG, 2006).

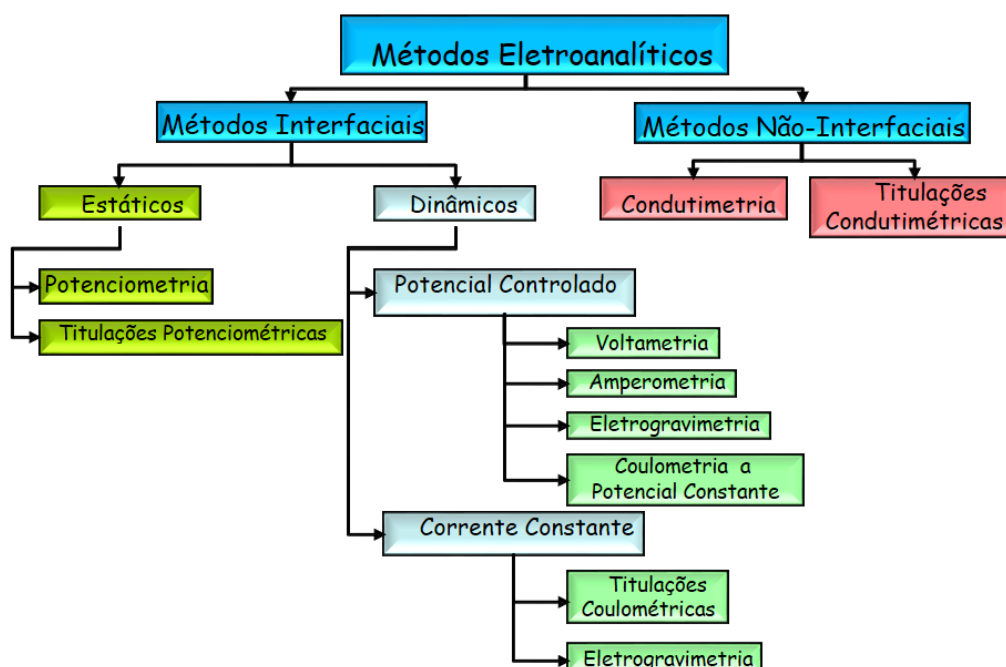
Eles consistem na aplicação de um potencial que varia com tempo no eletrodo de trabalho. Isto resulta na ocorrência de reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas em solução - a corrente resultante de uma mudança no estado de oxidação da espécie eletroativa é denominada corrente faradaica porque obedece à lei de Faraday e uma corrente capacitiva devido ao carregamento da dupla camada (WANG, 2006).

A técnica de varredura em potencial é normalmente utilizada em eletrodos estacionários. Seu uso principal é diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas, para a identificação de espécies presentes na solução (BRETT,1993).

O objetivo das experiências eletroanalíticas de potencial controlado é obter uma resposta de corrente que esteja relacionada com a concentração da molécula alvo. O gráfico de corrente versus potencial (i vs E) resultante, conhecido como voltamograma, é um display de sinal de corrente (eixo vertical) em relação ao potencial (eixo horizontal). A forma e magnitude exatas da resposta voltamétrica é governada pelos processos envolvidos na reação do eletrodo. A corrente total é a soma das correntes faradaicas bem como a corrente capacitiva. Tal objetivo é conseguido através do controle da transferência de elétrons durante o processo redox do analito (WANG, 2006).

Existem diversos métodos eletroquímicos utilizados para análises químicas, como explicitado na figura abaixo:

Figura 5: Métodos Eletroquímicos.



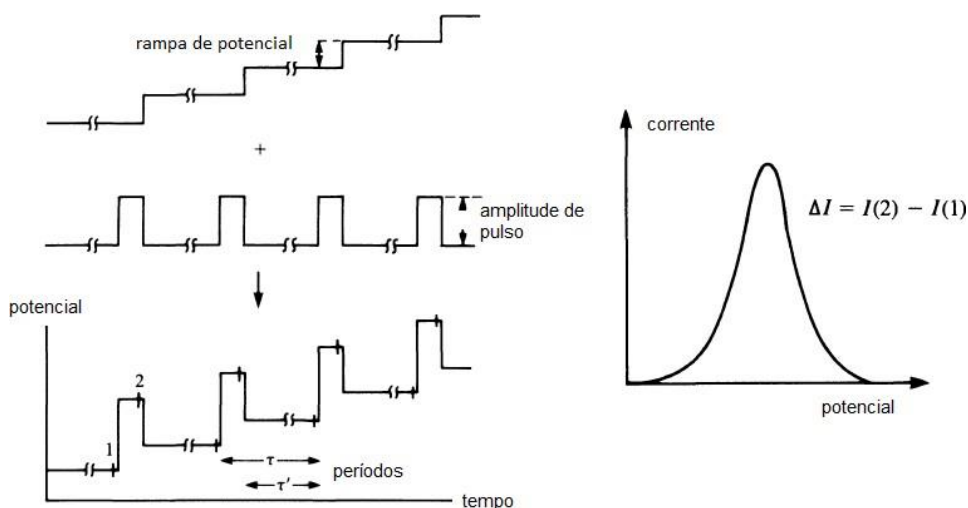
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

A técnica da voltametria, a qual, é uma técnica eletroanalítica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos, sendo um deles o eletrodo de trabalho e o outro um eletrodo de referência. O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente, logo, a curva da corrente em função do potencial obtida é chamada de voltamograma, duas técnicas voltamétricas muito empregadas são a voltametria de pulso e a voltametria cíclica.

2.4.1. Voltametria de Pulso

A voltametria de pulso é baseada na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. Os atributos da corrente medida estão relacionados com a largura do pulso e com o degrau de potencial que é aplicado no eletrodo para estimular o processo faradaico. Depois de aplicar um pulso de potencial, a corrente capacitiva desaparece mais rapidamente do que a corrente faradaica, assim as medidas de corrente são feitas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante. Este tipo de amostragem tem a vantagem de um aumento na sensibilidade e melhores características para aplicações analíticas.

Existem diferentes tipos de voltametria de pulso, como: Voltametria de pulso normal; Voltametria de onda quadrada; Voltametria de escada e Voltametria de pulso diferencial. No entanto, a técnica utilizada no experimento foi a voltametria de pulso diferencial (VPD), a qual, é caracterizada por ter o potencial da base incrementado entre pulsos, porém esses incrementos são iguais (Figura 6) e ainda é possível observar que a corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e o fim do pulso, sendo a diferença entre as duas correntes o valor registrado, conforme é mostrado na figura abaixo. Ao aumentar substancialmente a proporção entre as correntes faradaica e não faradaica, estas técnicas permitem uma quantificação conveniente até ao nível de concentração 10^{-8} M (BRETT et al., 1993).

Figura 6: Esquema de uma VPD

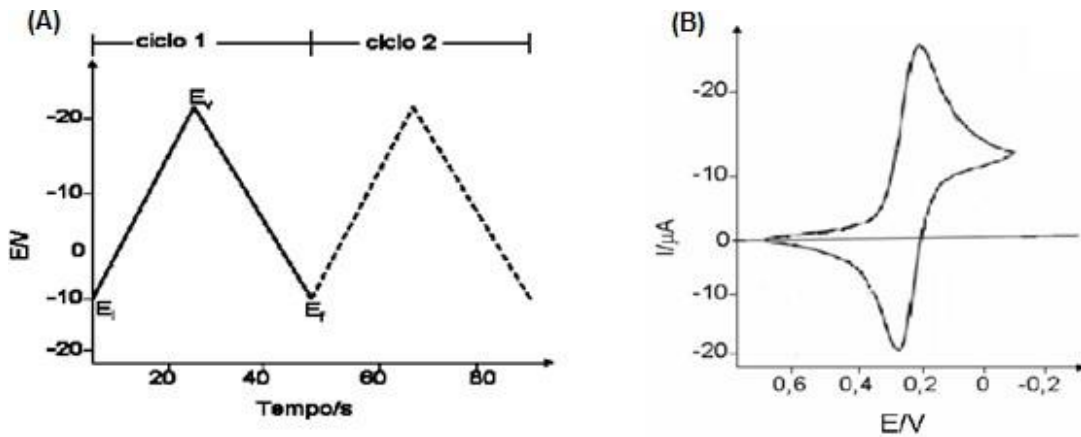
Fonte: Pacheco, 2013.

2.4.2. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma técnica utilizada constantemente para analisar espécies eletroativas, sendo possível determinar mecanismos de reação e constantes de velocidade. Na voltametria cíclica avalia-se de maneira geral a cinética e termodinâmica dos processos eletroquímicos que ocorrem em uma região de potencial elétrico, sendo escolhida geralmente como técnica de entrada em vários tipos de experimentos. Esta técnica é possivelmente a mais usada para a obtenção de dados qualitativos sobre as reações eletroquímicas. Com a voltametria cíclica é possível obter informações sobre: potencial de deposição, sobrepotencial de nucleação, reversibilidade da reação, controle cinético da reação entre outros (WANG, 2001).

A técnica consiste em uma varredura triangular de potencial versus tempo (Figura 7A), ou seja, começa em um potencial inicial (E_i) onde não há nenhum processo de oxidação ou redução de interesse até um segundo potencial (E_v) onde há a inversão da varredura até o potencial final (E_f) (Figura 7A), geralmente a uma mesma velocidade de varredura (GREEF et al., 1985). Dependendo do objetivo do estudo podem ser feitos somente um ou vários ciclos, com ou sem modificação de parâmetros. Durante a varredura, o instrumento (potenciostato) registra a corrente resultante do potencial aplicado (WANG, 2001) e a curva resultante do registro de corrente versus potencial é chamada voltamograma cíclico (Figura 7B).

Figura 7: Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica (A). Voltamograma cíclico para um sistema reversível (B).



Fonte: LOURENÇÃO, 2009 (Adaptado).

A voltametria cíclica é caracterizada por alguns parâmetros importantes: potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}), correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}), potencial de meio-pico anódico ($E_{p/2}$) e potencial de meia-onda ($E_{1/2}$). A definição de $E_{1/2}$ vem da polarografia clássica (de acordo com a equação 1).

$$E_{1/2} = E^{\circ'} + (RT/nF) \ln(D_R/D_O)^{1/2} \quad (1)$$

Na equação (1), $E^{\circ'}$ é o potencial formal relativo à força iônica da solução usada, D_O e D_R são os coeficientes de difusão das formas oxidada e reduzida, respectivamente, e n é o número de elétrons na semi-reação. Se D_O e D_R forem iguais, $E_{1/2}$ será o próprio $E^{\circ'}$ (EVANS et al., 1983).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolvimento de um sistema de análise para determinação de compostos de grande interesse como aflatoxina B1.

3.2. Específico

- Promover a modificação dos eletrodos impresso de carbono com diferentes materiais carbonáceos (MWCNTs , MWCNT-COOH, NANOFITAS e GO);
- Investigar a atuação do ácido xanturênico na superfície dos eletrodos modificados;
- Imobilizar o aptamer no eletrodo impresso modificado;
- Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas entre o analito/superfície do eletrodo modificado, fazendo uso de técnicas eletroquímicas;
- Otimizar os parâmetros experimentais tais como: pH e velocidade de varredura, sobre o sinal analítico;
- Aquisição de dados eletroquímicos por meio de técnicas voltamétricas como: voltametria de pulso e voltametria cíclica;
- Realizar estudos de possíveis interferentes, bem como verificar a estabilidade do sensor.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Materiais e Reagentes

Todas as substâncias utilizadas durante os procedimentos experimentais foram de grau analítico (tabela 1).

Tabela 1: Reagentes utilizados durante o processo de construção dos sensores químicos.

Reagentes	Fórmula molecular	Fornecedor
Nanotubo de carbono de paredes múltiplas(MWCNTs)	-	Sigma-Aldrich
Nanotubo de carbono de paredes múltiplas carboxilado (MWCNT-COOH)	-	Drop Sens
Óxido de grafeno reduzido (rGO)	-	Sigma-Aldrich
Nanofitas	-	Sigma-Aldrich
N,N-dimetilformamida (DMF)	HCON(CH ₃) ₂	Sigma-Aldrich
2-etoxietanol	C ₂ H ₅ OCH ₂ CH ₂ OH	Sigma-Aldrich
N-hidroxisuccinimida (NHS)	C ₄ H ₅ NO ₃	Sigma-Aldrich
Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)	C ₈ H ₁₇ N ₃	Sigma-Aldrich
4,8- diidroquinolina-2-ácido carboxílico (ácido xanturênico (AX))	C ₁₀ H ₇ NO ₄	Sigma-Aldrich
APTAMER (APT)	-	Macrogen
Aflatoxina B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio monobásico (PBS)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	Sigma-Aldrich
Ácido Clorídrico	HCl	Sigma-Aldrich

Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

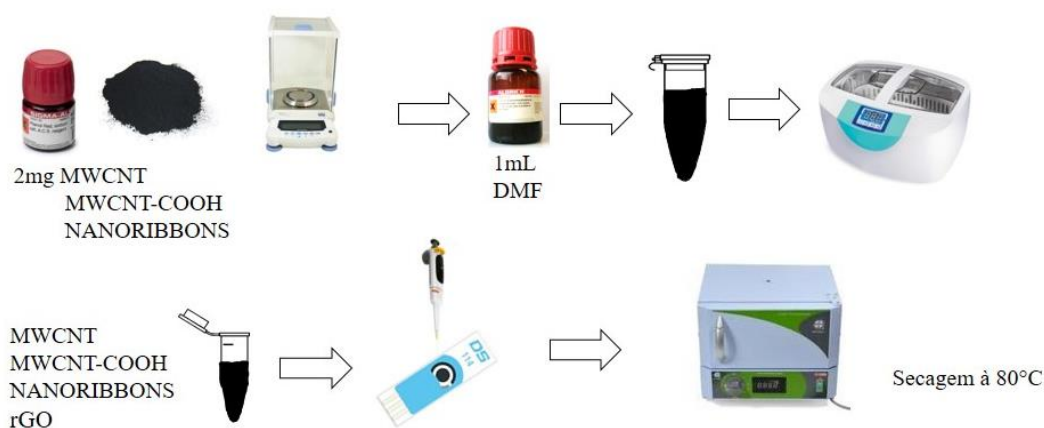
As soluções foram preparadas com água purificada em um sistema Milli-Q (18,2 MΩ cm, Millipore (Merck), Darmstadt, Alemanha). Os valores de pH das soluções tampão foram ajustados com soluções de NaOH e HCl e determinado com um pHmetr (Tecnopon mPA 210).

4.2. Modificação do Eletrodo impresso de Carbono

Inicialmente para realizar a modificação na superfície do eletrodo impresso de carbono (SPE - *Screen-printed electrodes*) os nanomateriais (MWCNTs , MWCNT-COOH,

NANOFITAS e rGO), foram pesados 2mg de cada um, separadamente, logo em seguida foi adicionado 1mL de DMF e assim, as soluções foram levadas para serem dispersas em ultrassom por aproximadamente 1h. Após a dispersão das soluções, foi depositada sobre a superfície de eletrodos impressos de carbono alíquotas de 1 μ L, totalizando entre 5 μ L a 10 μ L, com secagem em estufa a 80 °C para adição da alíquota seguinte, conforme é mostrado na figura 8. Foi utilizado o oxido de grafeno reduzido previamente preparado pelo grupo de pesquisa.

Figura 8: Esquema da modificação do eletrodo de carbono.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa, 2019.

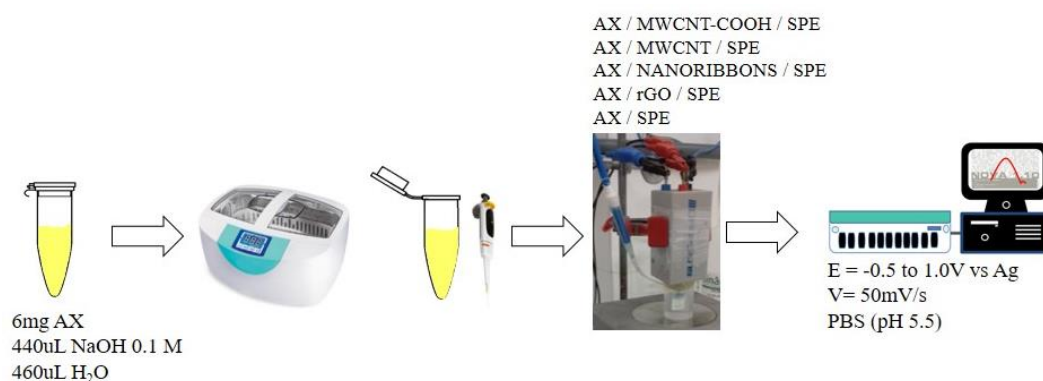
Para desenvolver as plataformas nanoestruturadas, onde a fase sensora é responsável pelo reconhecimento seletivo da micotoxina AFB1, com uso de ácido xanturênico (AX), adição de NHS/EDC e imobilização do APTAMER, optou-se estrategicamente por realizar três etapas, sendo estas descritas a seguir de acordo com os figuras 9, 10 e 11, após as modificações do eletrodos com os nanomateriais.

4.3. Ativação do SPE/Nanomateriais com o Ácido Xanturênico (AX)

Para dar continuidade à construção do sensor, foi adicionado em um Eppendorf 6mg de AX, acrescentou-se 440 μ L NaOH numa concentração de 0.1 M, para neutralizar a solução e ainda foi adicionado 460 μ L H₂O, em seguida a solução foi levada para ser dispersada em ultrassom por aproximadamente 40min. Esta solução foi utilizada nos diferentes eletrodos modificados, como é mostrado na figura 9. Após a adição do AX, foi montado o sistema com o eletrodo na presença de AX / MWCNT-COOH / SPE; AX / MWCNT / SPE; AX / NANOFITAS / SPE; AX / rGO / SPE e AX / SPE. Sendo assim, por meio do Software: NOVA

1.10, foram realizadas varreduras com uma faixa de potencial de -0.5 a 1.0 V vs Ag numa velocidade de 50mV/s, em solução tampão com pH de 5,5.

Figura 9: Adição e polimerização do AX no eletrodo.

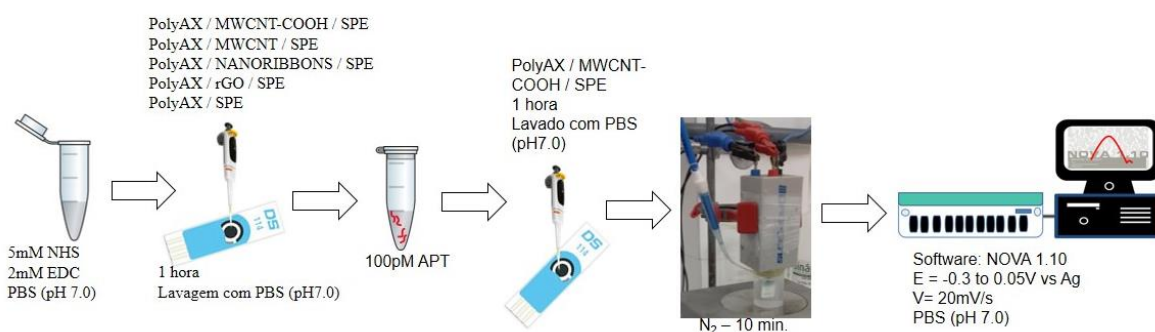


Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

4.4. Imobilização do APTAMER e aplicação da AFB1

Após a adição de AX e sua polimerização na superfície do eletrodo, foi adicionado 5mM da solução NHS e 2mM de EDC, atuando como catalizadores, na presença de PBS com pH 7,0. Após 1h foi feita lavagem com a solução tampão e em seguida adicionou-se 6 µL de APT (100 pM) em alíquotas de 2 µL cada. O APT ficou sob a superfície do eletrodo de trabalho por 1h e 30 min, sendo lavado com PBS (pH= 7,0) ao passar esse tempo, logo o eletrodo foi submerso na célula eletroquímica e posteriormente analisado por meio do Software: NOVA 1.10, realizando varreduras em uma faixa de potencial de -0.3 para 0.05V vs Ag, numa velocidade de 20mV/s, em solução tampão (PBS) com pH 7,0 (Figura 10).

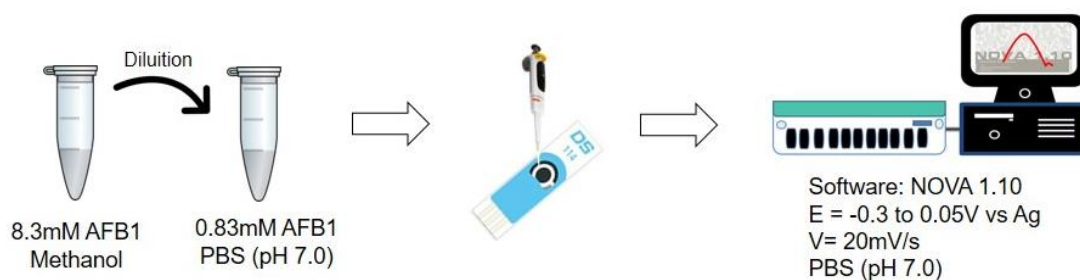
Figura 10: Adição de NHS/EDC e imobilização de APTAMER.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

Por fim, utilizando uma solução na presença da AFB1 (8,3Mm) dissolvida em metanol, foi feita uma diluição com uma solução tampão fosfato (pH = 7,0), em seguida a solução diluída de AFB1 foi adicionada pouco a pouco até completar a superfície do eletrodo (10 μ L). Posteriormente, após determinado tempo, o eletrodo foi lavado com água e novamente levado para célula eletroquímica. Por meio do potenciostato foram feitas varreduras com uma faixa de potencial de -0.3 para 0.05V vs Ag, numa velocidade de 20mV/s, na presença de solução tampão (PBS) com pH 7.0, conforme é mostrado na figura 11.

Figura 11: Adição da aflotoxina B1.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

O comportamento do sistema foi estudado através de técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica e pulso diferencial a fim de obter parâmetros analíticos tais como: tempo de resposta, seletividade, estabilidade operacional e tempo de vida útil.

4.5. Equipamentos

4.5.1. Medidas eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato da Echo Chemie (Autolab® modelo PGSTAT-30) (Utrecht, Netherlands) interfaceado a um microcomputador através Software NOVA 1.10 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

Figura 12: Potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Echo Chemie.



Fonte: Metrohm, 2019.

O sistema para análise da superfície do eletrodo foi constituído de uma célula eletroquímica, com capacidade para 11,0 mL de solução tampão fosfato, onde o eletrodo impresso foi submerso nesta solução, semelhante a figura 13.

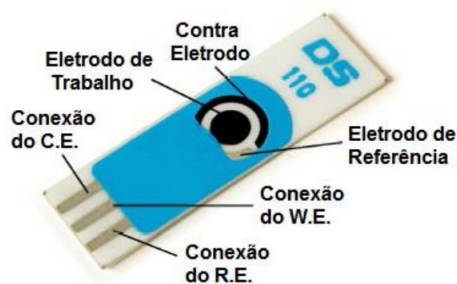
Figura 13: Célula eletroquímica para eletrodos impressos.



Fonte: Metrohm,2019.

O eletrodo submerso em solução, contém em sua estrutura o eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e o contra eletrodo, mantendo assim o potencial estável controlando a corrente elétrica que circula através da célula eletroquímica, entre o eletrodo de trabalho e um contra eletrodo, conforme é mostrado na Figura 14.

Figura 14: Eletrodo impresso de carbono com os três eletrodos: Trabalho (WE), referência (RE) e contra eletrodo (CE).



Fonte: Dropsens, 2019.

As medidas foram realizadas em meio prático usando 11 mL de soluções tampão fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio ($\text{N}_2(\text{g})$) nas soluções durante 10 minutos antes das análises, possibilitando assim um ambiente inerte e livre de oxigênio durante as análises realizadas nos experimentos. Todas as medições foram realizadas em temperatura ambiente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

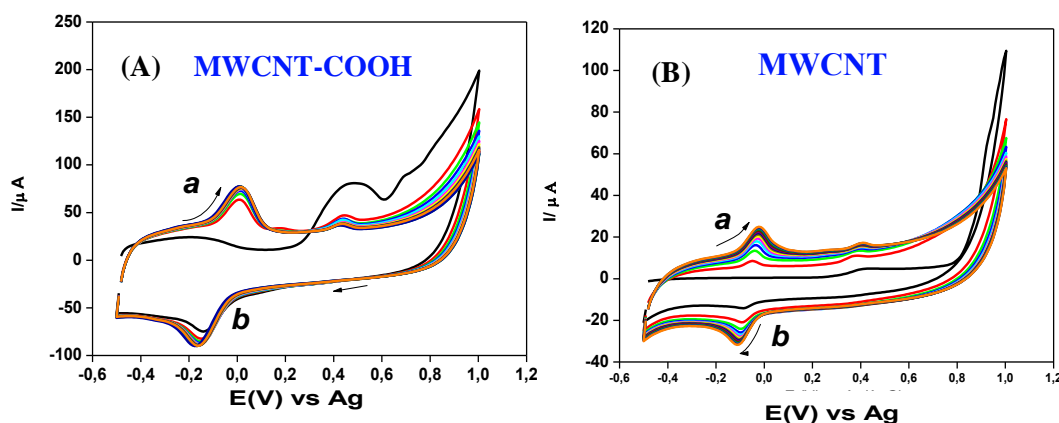
As caracterizações eletroquímicas foram realizadas no intuito de se obter conclusões no tocante a vários fatores, como: comportamento do AX na solução tampão, comprovação do AX na fase sensora do eletrodo, utilização do aptamer para interagir com a molécula alvo, determinação e detecção da AFB1, como também a eficiência do sensor em questão. Sendo assim, como já supracitado, os testes foram realizados por meio da caracterização eletroquímica.

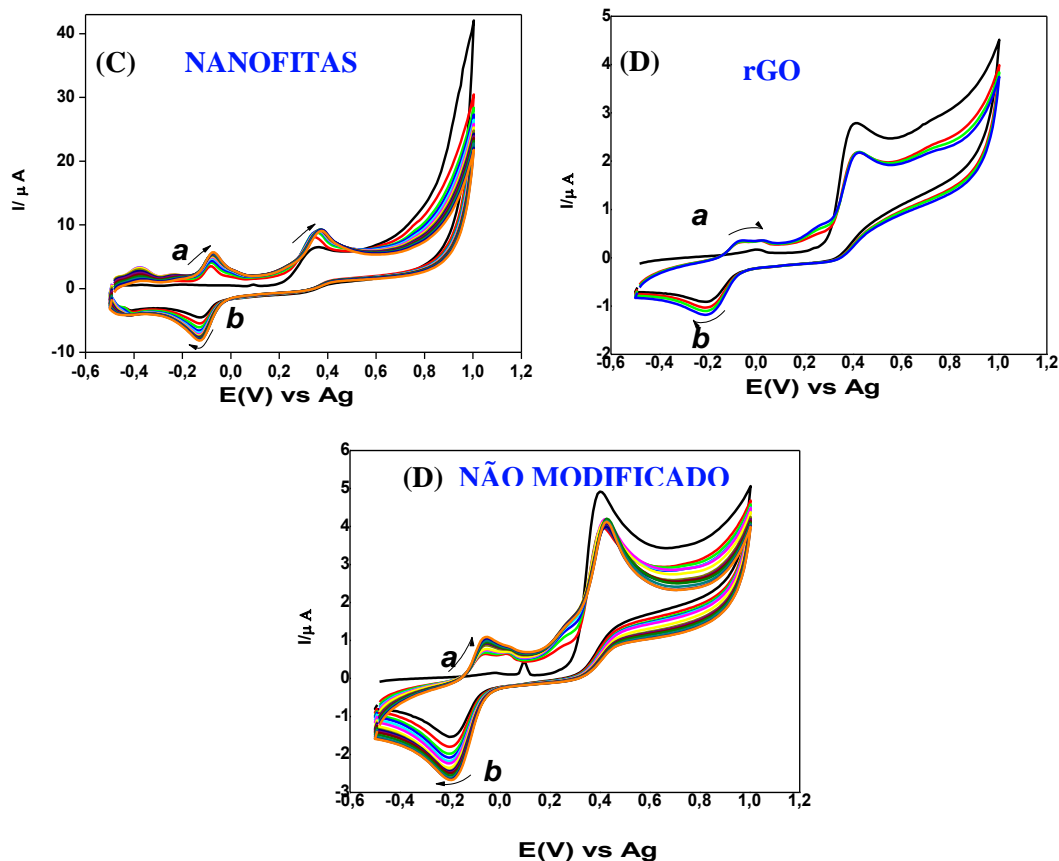
5.1. Caracterização eletroquímica: Adição e polimerização do AX no eletrodo.

Inicialmente, estudos eletroquímicos via técnica de voltametria cíclica foram realizados com o intuito de verificar as propriedades eletroquímicas do AX frente aos eletrodos impressos, previamente modificados com os diferentes materiais carbonáceos, antes do processo de imobilização do aptamer. Assim, com o intuito de analisar o comportamento eletroquímico do AX na superfície do eletrodo, realizou-se uma varredura no sentido anódico, para verificar a formação dos picos de oxidação e redução, os quais, correspondem a um processo de transferência de elétrons quase-reversível. Selecionando uma faixa de potencial de 0,5 V a -1,0 V vs. Ag, com uma taxa de velocidade de varredura (v) de 50 mV s⁻¹ (figura 15) o AX foi adicionado em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,5).

O processo de modificação do eletrodo pela adição dos nanomateriais utilizados é de suma importância para a atividade eletrocatalítica, o que nos leva a concluir que os nanomateriais exercem um papel importante na modificação da fase sensora do eletrodo, não só aumentando a área ativa, mas de alguma maneira, interagindo na formação e estabilidade do polímero gerado após a ativação do ácido xanturênico.

Figura 15: (A) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ MWCNT-COOH. AX 120 uM em PBS 0.1 mol/L, pH 5.5 e v 50mV s⁻¹, 15 ciclos. (B) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ MWCNT. (C) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ Nanofitas. (D) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/rGO. (E) Sucessivos voltamogramas da eletropolimerização do AX em SPE/ não modificado.





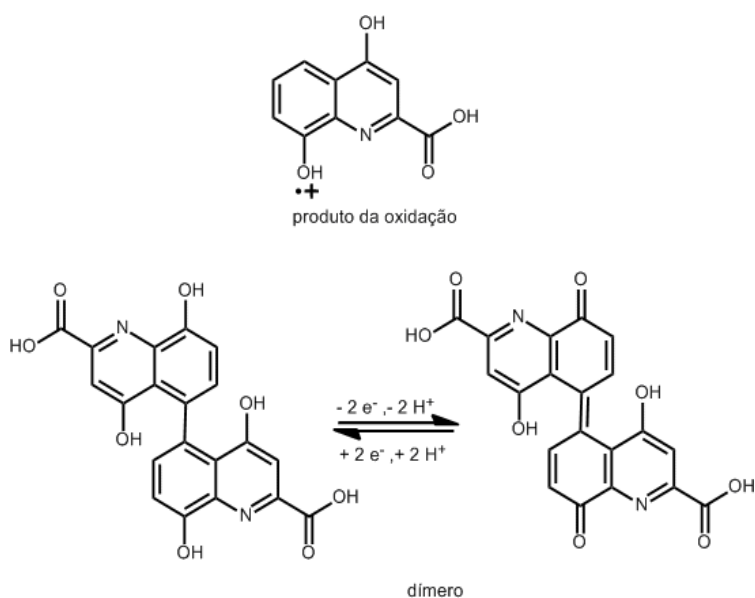
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

O grupo redox quinona (GRQ), foi eletroquimicamente gerado *in situ* a partir do AX (processo de eletropolimerização) nos eletrodos impressos modificados com os nanomateriais, sendo possível perceber que o ácido xanturênico exibiu resposta característica de espécies redox confinadas nos eletrodos. Os voltamogramas cíclicos obtidos, apresentaram um pico de oxidação irreversível em torno de 0,4 V vs. Ag, que corresponde ao início do processo eletropolimerização. Assim, como a figura 15 indica, no sentido catódica da varredura de potencial, um novo pico (pico *b*) é formado, e seu par redox correspondente (pico *a*) é eletrogerado e ambos aumentam progressivamente com as sucessivas varreduras, indicando que a superfície do eletrodo de trabalho é coberta gradualmente com um filme eletroativo. O par redox representado pelos picos *a* e *b* corresponde a um processo de transferência de elétrons reversível. Na figura 15D, apresenta-se um eletrodo não modificado, onde obtemos um voltamograma característico para o eletrodo impresso frente a sonda eletroquímica utilizada.

Com base na literatura é possível verificar possíveis estruturas do produto de oxidação e dimerização do AX (Figura 16). A quinona resultante pode ser oxidada reversivelmente à

correspondente hidroquinona, formando, portanto, um par redox na superfície eletrodica, por meio de um processo redox de $2e^-/2H^+$. Esse par redox é um bom candidato a catalisador, tanto através dos dois elétrons envolvidos durante o processo redox, quanto pela liberação de prótons. O dímero formado apresenta um sistema quinona/hidroquinona, o qual representa o grupo mediador (HACCOUN et al., 2006). Após o processo de polimerização, o ácido xanturênico adsorvido na fase sensora foi denominado de Poli-AX e os eletrodos referenciados como, por exemplo, de SPE/MWCNT/poli- XA.

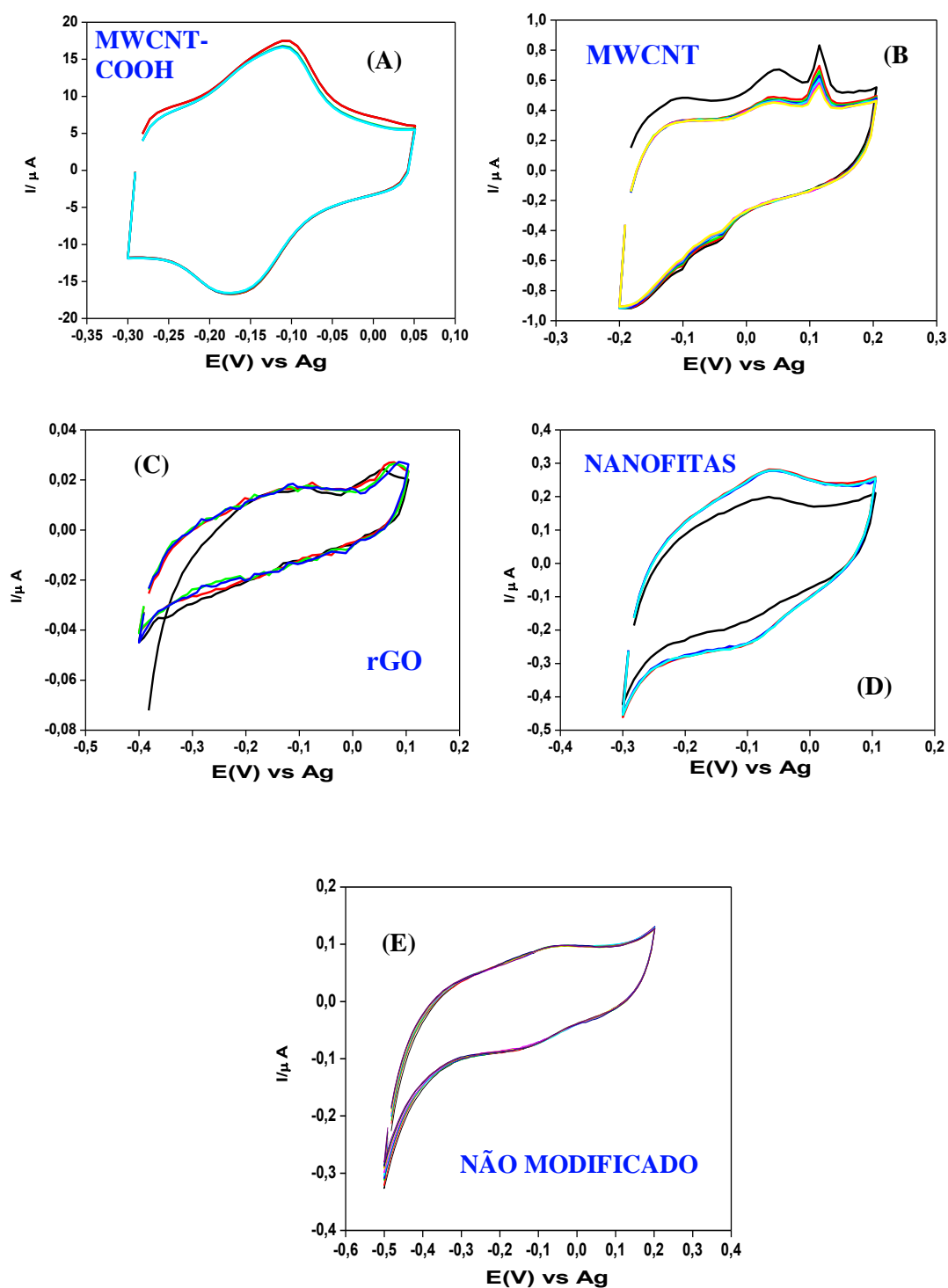
Figura 16: Estruturas do possível produto de oxidação e dímeros do XA.



Fonte: Haccoun et al., 2006

Após o processo de eletropolimerização do ácido xanturênico em meio ácido, e formação do par redox na superfície do sensor, um novo sistema eletroquímico foi montado, utilizando uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) a fim de verificar o comportamento do XA incorporado na fase sensora. Para isso, foi restringida a faixa de potencial para cada um dos eletrodos modificados, bem como a velocidade de varredura ($v = 20 \text{ mV/s}$) conforme a formação dos pares redox durante o processo de polimerização, conforme mostra a figura 17.

Figura 17: Sucessivos voltamogramas (A) SPE/ MWCNT-COOH/ Poli-AX; (B) SPE/ MWCNT / Poli-AX; (C) SPE/ NF /Poli-AX ; (D) SPE/ rGO / Poli-AX; (E) SPE/Poli-AX em PBS 0.1 mol/L, pH 7.0 e $v = 20\text{mVs}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa, 2019.

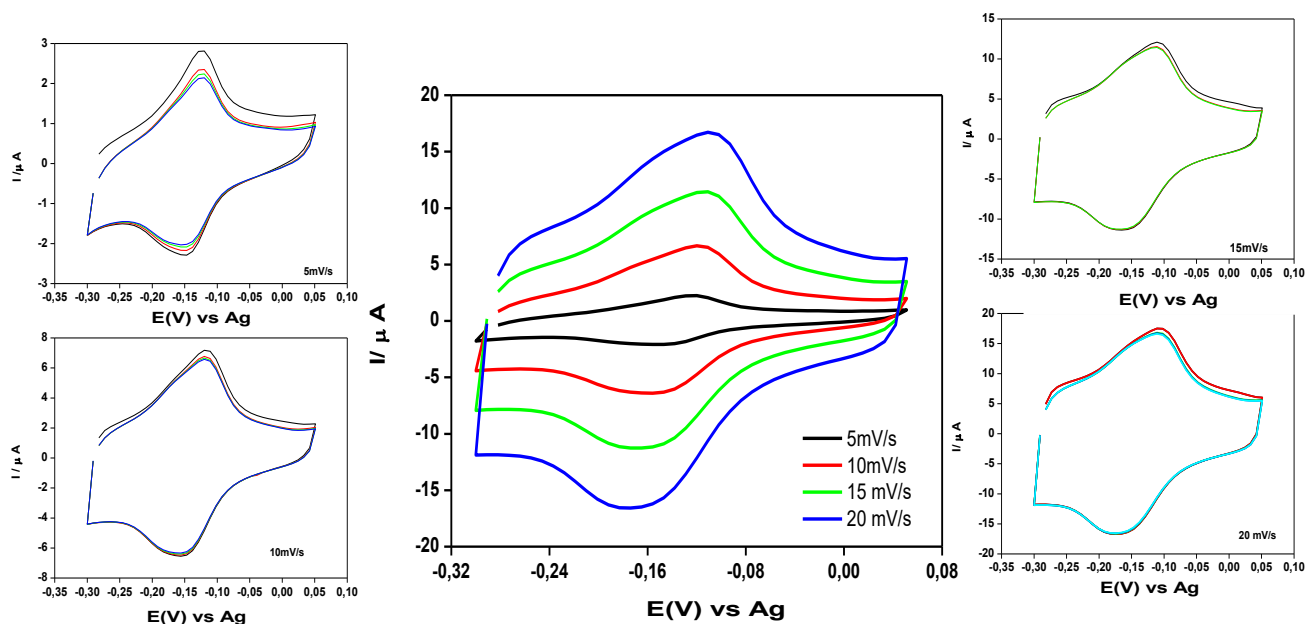
Ao observar o comportamento do par redox eletrogerado da polimerização do AX, percebe-se que os picos voltamétricos persistentes e bem definidos só se apresentaram no eletrodo modificado com MWCNT-COOH (figura 17), indicando que o processo redox da

espécie ativa do AX exibe uma melhor característica de espécies confinadas na superfície do eletrodo, desta forma, tal sensor foi selecionado para seguir com as demais análises. Assim, foi possível realizar um estudo entre a intensidade de corrente de pico e a velocidade de varredura, conforme é mostrado na figura 18.

5.2. Estudo do efeito da velocidade de varredura de potenciais

O efeito da velocidade de varredura foi analisado utilizando o sensor em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) do eletrodo modificado variando de 5 a 20mVs⁻¹, conforme figura 18.

Figura 18: Sucessivos voltamogramas de SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX em diferentes faixas de varredura (5mVs⁻¹ a 20mVs⁻¹).



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa, 2019.

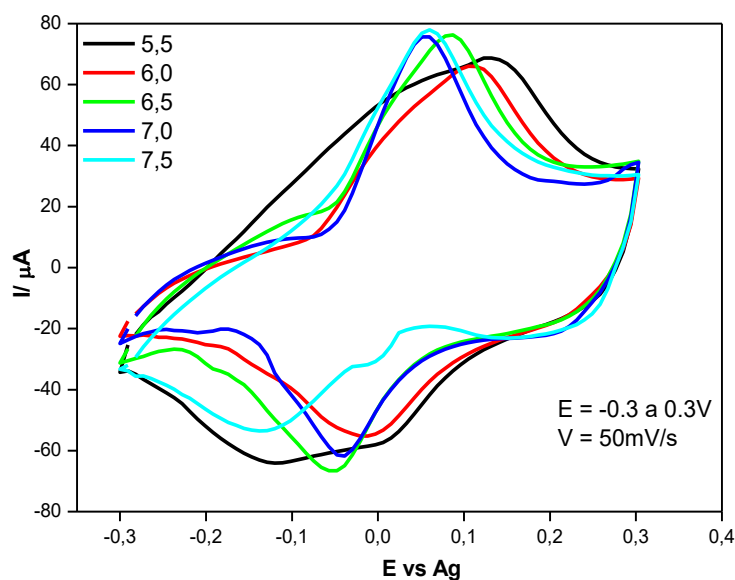
Os voltamogramas, na figura 18 indicam reversibilidade no processo redox do sistema SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX, apesar de não haver total simetria dos picos anódicos e catódicos. Outro aspecto que deve ser observado é a correlação linear entre a intensidade de corrente de pico e a velocidade de varredura, sendo possível verificar que o aumento da velocidade de varredura de potencial (v) leva a um aumento tanto da corrente de pico de oxidação ($I_{p_{ox}}$) quanto da corrente de pico de redução ($I_{p_{red}}$) do eletrodo modificado,

confirmando que a espécie eletroativa gerada a partir do ácido xanturênico está adsorvida sobre a superfície do eletrodo modificado com MWCNT-COOH.

5.3. O efeito do pH no comportamento redox do eletrodo modificado

O comportamento eletroquímico da espécie eletrogerada a partir da oxidação do AX que estava adsorvida no eletrodo, resulta do pH do meio. Sendo assim, na figura 19 é apresentado o efeito do pH no meio sobre a corrente de pico anódico e catódico do SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) variando o valor de pH em 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5.

Figura 19: Efeito do pH no comportamento redox do SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX, voltamogramas obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa, 2019.

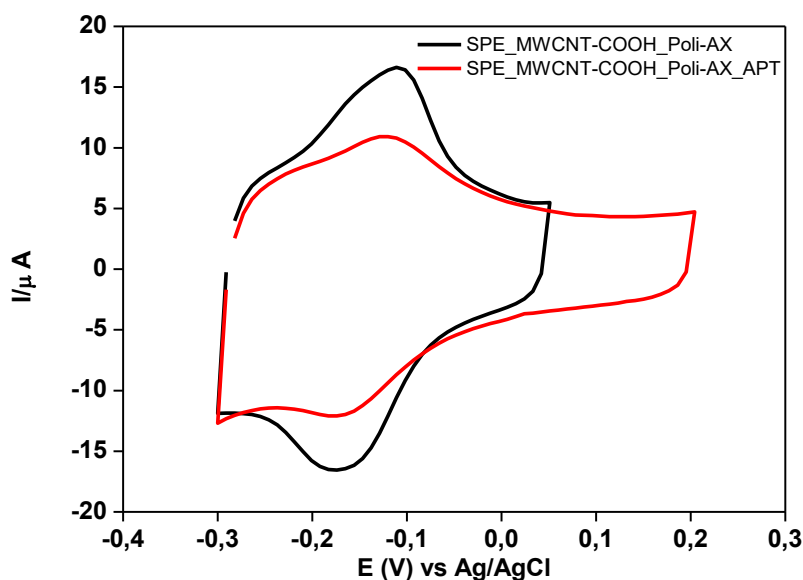
Analisando os voltamogramas da figura 19, observa-se o deslocamento dos picos de oxidação para potenciais menores a medida que aumenta o valor do pH, o que está de acordo com os mecanismos de oxidação do ácido xanturênico (figura 15 e 18), no qual, se verifica a libertação de dois prótons e dois elétrons. Levando em consideração o princípio de Le Chantelier, este processo é facilitado em pH elevado pois tem excesso de íons OH^- o que consome mais prótons H^+ deslocando o equilíbrio para a direita no sentido de facilitar a oxidação dos compostos fenólicos. Observa-se ainda que os melhores valores de corrente de pico catódico e anódico foram para a solução de pH 7,0, apresentando picos mais simétricos e

mais estáveis. Dessa forma, como é possível observar, a posição do potencial e do pico depende do pH.

5.4. Estudo da eletrooxidação da AFB1

Após o procedimento de ativação *in situ* na superfície do eletrodo modificado como previamente descrito, foi realizada a imobilização de aptamer (APT) aplicado com intuito de testar a atividade electrocatalítica para oxidação da AFB1. Inicialmente, as respostas voltamétricas do sensor SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX , foram obtidas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7 na ausência e presença de APT 100 pM com $v = 20\text{mVs}^{-1}$, conforme a figura 20. Após adição do APT, houve uma diminuição da corrente de pico anódica, ao passo que uma pequena corrente catódica foi observada na varredura reversa. Este comportamento é consistente com um forte efeito de objeção a transferência de carga, ou seja, o APT estava retendo a carga no eletrodo.

Figura 20: Sucessivos Voltamogramas cíclicos de SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX em PBS 0,1 mol / L, pH 7,0 e $v = 20\text{mVs}^{-1}$ na presença de APT 100pM (linha vermelha) e ausência APT (linha preta).



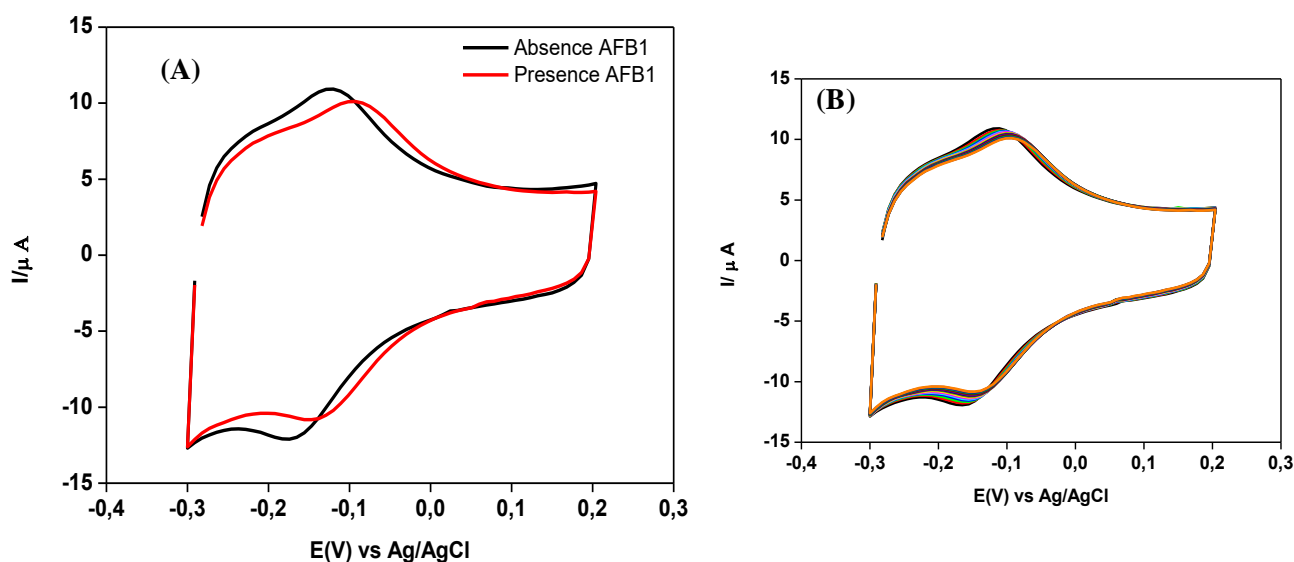
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

O AX em seu processo de oxidação apresenta dímero com um sistema quinona/hidroquinona, logo, conforme artigos reportados na literatura, os aptamers tem capacidade de curva-se em estruturas tridimensionais bem definidas e ligam-se aos seus ligantes por formar interações complementares, causando esta dificuldade na transferência de cargas e

essa diminuição dos picos de oxidação e a redução do AX, o qual é prejudicado com a adição do APT.

Ademais, os APT podem incorporar pequenas moléculas em sua estrutura de ácidos nucleicos ou integrar-se na estrutura de maior molécula (HERMANN et al, 2000). Este efeito de incorporação parece ser mais pronunciado em aptamers que se ligam a moléculas como as micotoxinas. Sendo assim, foi realizado um estudo voltamétrico, onde foi possível analisar o eletrodo na presença e na ausência da AFB1 (0,83 mM), com o APT já imobilizado na superfície do sensor, isto em solução tampão fosfato 0,1 mol / L (pH 7,0) e $v = 20\text{mVs}^{-1}$, conforme é mostrado na figura 21.

Figura 21: (A) Sucessivos voltamogramas cíclicos de SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX /APT em PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0 e $v = 20\text{mVs}^{-1}$ na presença de AFB1 0,83 mM (linha vermelha) e ausência AFB1 (linha preta). (B) Sucessivos voltamogramas cíclicos SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX /APT/ AFB1.



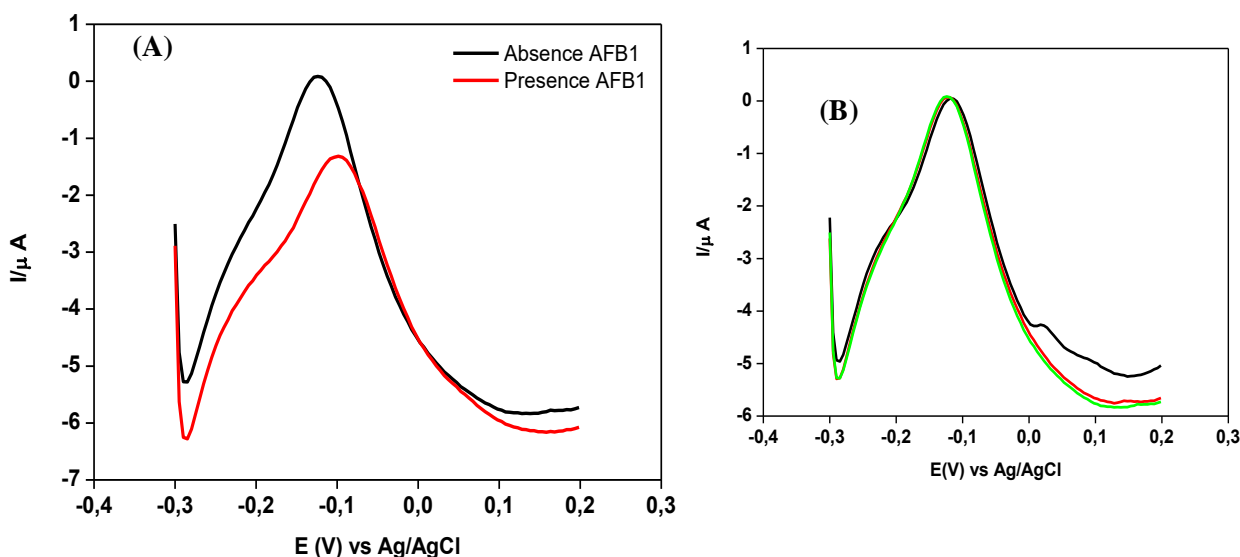
Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

Os resultados da detecção eletroquímica de AFB1 revelaram que, os picos de corrente dos voltamogramas cíclicos diminuíram ao aumentar a velocidade de varredura do eletrodo, mostrando assim a ligação de AFB1 aos aptamers imobilizados na superfície do biossensor conforme mostrado na Fig. 21B. A superfície do sensor composta de aptamers de DNA é carregada negativamente, este provoca repulsão de indicadores redox negativamente carregados da superfície, sendo assim a adição de analito, dependendo da sua carga, torna possível a modificação das propriedades na fase sensora do eletrodo, causando essa diminuição dos picos anódicos e catódicos (CASTILLO et al.,2015). No caso de AFB1, uma molécula

bastante ácida ($pK \frac{1}{4} 5.84 \pm 0.05$), de acordo com a literatura, é de se esperar essa diminuição nos picos de oxidação-redução, após sua adição à superfície do sensor, logo, na condição experimental utilizada, a AFB1 é carregada negativamente. Portanto, a ligação AFB1 ao aptâmer causará um aumento na carga negativa da superfície e posterior repulsão do par redox a superfície.

Além disso, foi realizada a voltametria de pulso diferencial (VPD) empregada com o intuito de corroborar com a técnica de voltametria cíclica (VC), verificando por meio de outra técnica eletroquímica que o processo de transferência de carga é dificultada na presença do APT e da AFB1. Sendo assim, foi possível analisar o eletrodo na ausência e na presença da AFB1, conforme é mostrado na fig. 22.

Figura 22: (A). VPD de SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX /APT, na presença de 0,83 mM de AFB1 (linha vermelha) e ausência de AFB1 (linha preta), (B) VPD de SPE / MWCNT-COOH/ Poli-AX /APT em PBS 0,1 mol / L, pH 7,0 e v 20mVs⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor da pesquisa,2019.

Levando em consideração a interação forte, porém reversível, entre APT e AFB1, reações competitivas de AFB1 com APT fortemente conjugado na superfície do eletrodo sólido e provável presença de APT livre em solução devem ocorrer, em virtude do deslocamento de equilíbrio. Sendo assim, estas moléculas simples de ácido nucléico (aptamers) possibilitam aumento a imobilização e promovem maior seletividade, já que os mesmos, mantêm um aspecto biológico desejado. As elevadas características e afinidade possibilitam que o aptamer se ligue

apenas à molécula alvo de interesse para, a qual, foi projetado com simplicidade, sem qualquer interferência, tornando-o uma opção interessante para o diagnóstico de micotoxinas.

6. CONCLUSÃO

O sensor proposto neste trabalho (SPE/MWCNT-COOH/Poli-AX/APT), demonstrou a eficiência do novo medidor redox AX junto com os APT utilizados no procedimento de formação de monocamadas para estudo da oxidação eletrocatalítica da Aflotoxina B1. Além disso, os nanotubos carboxilados constituem um excelente ambiente para a adsorção do mediador, capazes de promover a detecção da AFB1, com ótima sensibilidade e estabilidade.

A eficiência do medidor foi evidenciada pela possibilidade do produto de oxidação e dimerização do AX quando submetido à eletropolimerização na superfície do eletrodo. A ativação *in situ*, gerou um par redox quinona/hidroquinona, o qual não apresentou atividade eletrocatalítica para o aptamer, uma vez que, ao reagir com o aptamer não houve transferência de elétrons, mas sim uma retenção de carga. Ademais, visto que o aptamer pode incorporar-se à estrutura da AFB1, percebeu-se também certa diminuição nos picos de oxidação e redução uma vez que a ligação AFB1 ao aptamer pode causar um aumento na carga negativa da superfície e posterior repulsão do par redox a superfície, tornando-se uma alternativa viável para a detecção de AFB1 em baixos potenciais, em meio neutro.

Portando, o estudo desse eletrodo, indica a viabilidade do aptasensor como uma estratégia complementar na análise de AFB1 contaminado em milho e outros alimentos, por exemplo, oferecendo vantagens sobre outras técnicas analíticas em termos sensibilidade, estabilidade, tempo de análise e relação custo-benefício. Os trabalhos adicionais estão em andamento para melhorar a seletividade do aptasensor para amostras reais, bem como o desenvolvimento de modelagem computacional do complexo APT-micotoxinas, caracterização de plataformas, síntese e caracterização de Molecularly Imprinted Polymer (MIP) para micotoxinas.

7. PERSPECTIVAS

- Desenvolvimento de plataforma nanoestruturada para eletrooxidação de micotoxinas;
- Triagem eletroquímica de micotoxinas;
- Modelagem computacional do complexo APT-Micotoxinas;
- Síntese e caracterização das plataformas nanoestruturadas (MEV, AFM, TGA, DSC, UV-VIS, FTIR);
- Otimização multivariada das plataformas;
- Aplicação em amostras de interesse.

8. REFERÊNCIAS

- AHAMMAD, A. J. et al. Aminur. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. *Sensors*, v.9, p.2289-2319, mar 2009.
- ANDRADE, A. V. **Estudo e implementação de um sistema de testes rápidos para a avaliação de micotoxinas em aperitivos, frutos secos e desidratados em indústria alimentar.** Tese (Mestrado em processos químicos e biológicos) – Instituto Superior de Engenharia de Coimbra. Coimbra, p 39. 2017.
- ANDRADE, Patricia Diniz et al. **Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxinA in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid–liquid extraction with low temperature purification (LLE–LTP).** *Journal of Chromatography A*, p. 61–68, 2013.
- ANVISA, **Resolução da ANVISA RDC N° 7 de 18 de fevereiro de 2011.**
- ASSIS, F. **ÁCIDO XANTURÊNICO um novo mediador para eletro-oxidação de NADH.** Tese (Mestrado em química e biotecnologia)- Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2009.
- BANICA, F.G. **Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications.** John Wiley & Sons, 2012.
- BALA J. et al. **Aptamers in HIV research diagnosis and therapy.** *RNA Biology*. 2018; 15(3):327-337. DOI: 10.1080/15476286.2017.1414131.
- BELLUZO, M. S. et al. **Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics.** *Sensors*, v.8, p.1366-1399, fev 2008.
- BITTENCOURT, C.A.F. et al. **Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil.** *Food Control*, v. 16, p. 117-120, 2003.
- BRETT, C. et al. **Electrochemistry: principles, methods, and applications.** 1993.
- CAMPAGNOLLO, F.B. et al. **The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review.** *Food Control*, 68, 310-329, 2016.
- CAPELETTI, L. B.; **Efeitos da Rota Sol-Gel no Encapsulamento de Indicadores Colorimétricos e Fluorimétricos e em suas performances com sensores de pH e gás amônia.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CASTILLO, G. et al. **Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform.** Food control, v. 52, p. 9-18, June 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514006987>. Acesso em: 07 Jul. 2019.

CATALDO R. et al. **Modelling and development of electrical aptasensors: a short review.** Chemosensors. 2018; 6(2): 20. DOI:10.3390/chemosensors6020020.

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

CIOBANU, M. et al. 1 - Fundamentals. **Handbook of Electrochemistry**, p. 3-11, 2007.

COMISSÃO EUROPEIA. Recomendação da Comissão de 18 de Outubro de 2011 sobre a definição de nanomaterial. JOUE. 2011; L275:38-40.

COMPTON, R. G. et al. **Understanding voltammetry.** World Scientific, 2011

DIAS, Andrew D. et al. Recent Advances in Bioprinting and Applications for Biosensing. Biosensors. 2014.

DUMITRESCU, I. et al. Electrochemistry at carbon nanotubes: perspective and issues. **Chemical Communications**, v. 7345, p. 6886- 6901, 2009.

EDWARDS, G. A. Et al. Chemically Modified Electrodes. **Handbook of Electrochemistry**, [s.l: s.n.]. p. 295-327, 2007.

ELLINGTON, A. D. et al. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature, 346, 812 e 822, 1990.

EMBRAPA DOCUMENTOS 110. Micotoxinas: Importância na Alimentação e Saúde Humana e Animal. Outubro, 2007.

EVANS, D. H. et al. Cyclic Voltammetry. Journal of Chemical Education, v. 60, n. 4, p. 290, 1983.

EŽERSKIS, Z. et al. Electropolymerization of chlorinated phenols on a Pt electrode in alkaline solution part I: A cyclic voltammetry study. Journal of Applied Electrochemistry, v. 31, n. 10, p. 1117–1124, 2001.

FREIRE, R.S et al. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. Química Nova. v.26,p. 381-389, 2003.

- FRIZZARIN, A. et al. Técnicas utilizadas para detecção e quantificação de aflatoxina m1 no leite. B. Industr.anim., N. Odessa, p.165-173, 2012.
- GIGAULT, J. et al. S. Current opinion: What is a nanoplastic? Environ. Pollut. 235, (2018) 1030–1034
- GREEF, R. et al. Instrumental Methods in electrochemistry. 1ed., Ed. Ellis Horwood Limited. p. 42 – 75, 1985.
- HACCOUN J. et al. Chaussé A e Adenier A (2008). “Electrochemical grafting of organic coating onto gold surfaces: Influence of the electrochemical conditions on the grafting of nitrobenzene diazonium salt”, Prog Org Coat, 63, 18-24.
- HAN, Q. et al. The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 254 – 263, 2007.
- HASEGAWA, H. et al. Improvement of Aptamer Affinity by Dimerization. Sensors, v.8, p.1090-1098, fev 2008.
- HAUPT, K. et al. Molecularly imprinted polymers. In: **Molecular imprinting**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 1-28.
- HERMANNNS, G. et al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.26, n.1, jan./mar. 2006.
- HERBST, M. H. et al. Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. Química Nova, v. 27, No. 6, p. 986-992, 2004.
- HERMANN, T. et al. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. Science, 287, 820 e 825, 2000.
- HU, C. et al. Carbon nanotube-based electrochemical sensors: principles and applications in biomedical systems. Journal of Sensors, v. 2009, 2009.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em: >Acesso em: <https://www.iarc.fr/> > 10 mar. 2014.
- ICB. Instituto de Ciências Biológicas. Agentes Etiológicos das Intoxicações Fúngicas. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/mic/mic/material/2agentesetiologicosdasintoxicaesfungicas.pdf>>Acesso em: 10 mar. 2014.

- IDRIS, Y. M. A.; MARIOD, A. A.; ELNOUR, I. A. et al. Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 48, n. 8-9, p. 2539- 2541, 2010
- JAY, J. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005. —. *Modern Food Microbiology: Mycotoxins*. International Thomson Publishers, 1997.
- JANATA, J. Optical Sensors. In: **Principles of Chemical Sensors**. Springer US, 2009. p. 267-311.
- KAWASHIMA, L. M. *Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidas e comercializadas em diferentes regiões do Brasil*. 2004. 110 f. Dissertação (Doutorado) - UEC, Campinas, 2004.
- KRIZ, D., MOSBACH, K., Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polyme. *Analytica Chimica Acta*, p. 7175, 1995.
- LATTANZIO, Veronica M.T.; PASCALE, Michelangelo; VISCONTI, Angelo. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals *Trends in Analytical Chemistry*, 2009.
- LIMA, P. R. et al. An amperometric sensor based on electrochemically triggered reaction: Redox-active Ar–NO/Ar–NHOH from 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the low voltage cysteine detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 612, n. 1, p. 87-96, 2008
- LIU, C. C.; Review: Development of chemical sensors using microfabrication and micromachining techniques. *Materials Chemistry and Physics*, v. 42, p. 87 – 90, 1995.
- LOURO, H. et al. Nanomateriais manufaturados: novos desafios para a saúde pública. *Rev. Port. Saude Publica* 31, (2013) 145–157.
- LOURENÇÃO, B.C. **Determinação voltamétrica simultânea de paracetamol e cafeína e de ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de diamante dopado com boro**. *Dissertação (mestrado)* – Universidade Estadual Paulista, São Carlos, 2009.
- LU Y. et al. DNA-decorated graphene chemical sensors. *Applied Physics Letters*. 2010; 97(8): 083107. DOI: 10.1063/1.3483128.
- MALINA, H. Z.. *Biochem. Biophys. Res. Communication*, 265 (1999), 600.

- MASA, J. et al . Electrocatalysis and bioelectrocatalysis - Distinction without a difference. **Nano Energy**, v. 29, p. 466-475, 2016.
- MURAKAMI, K.; HANEDA, M.; YOSHINO, M. *BioMetas*, 19 (2006), 429.
- NAKAI, V. K. et al. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, v. 106, n. 1, p. 285-290, 2008
- NGUYEN, B. H. et al. Label-free detection of aflatoxin M1 with electrochemical Fe₃O₄/polyaniline-based aptasensor. *Materials Science and Engineering C*, 2013.
- OURARI, A. et al. Elaboration of new electrodes with carbon paste containing polystyrene functionalized by pentadentate nickel(II)-Schiff base complex – Application to the electrooxidation reaction of methanol and its aliphatic analogs. **Electrochimica Acta**, v. 170, p. 311-320, 2015.
- PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.
- PEREIRA, Kelly Cristina; DOS SANTOS, Carlos Fernando. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, p.147-165, 2011.
- PERERSON, S.W. et al. *Aspergillus bombycis*, anew aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A.nomius*. *Mycologia*, 2001.
- PERRONE, G. et al . *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic fungi: methods and protocols, methods in molecular biology*, 1542, 33-49, 2017.
- PRASAD,B.B. et al. Synthesis of novel monomeric graphene quantum dots and correponding nanocomposite with molecularly imprinted polymer for eletrochemical detection of na anticancerous ifosfamide drug. **Biosensors and Bioelectronics**. V. 94, p. 1-9, 2017.
- PRAKASH J.S. et al. Aptamers and their significant role in cancer therapy and diagnosis. *Biomedicines*. 2015; 3(3): 248-269. DOI: 10.3390/biomedicines3030248.
- PROKOPEC, V. and SVECOV, M. *Analytica Chimica Acta* The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures : A review sk a. 1031, (2018)
- RADI, A. E. Recent updates of chemically modified electrodes in pharmaceutical analysis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 13, p. 728-752, 2010.
- RATHEE, K. et al. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **B. and Biophysics Reports**, v. 5, p. 35-54, 2016.

- RAVERA, M. et al. DNA-Metallo drugs Interactions Signaled by Electrochemical Biosensors: An Overview. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v.2007, 2007.
- RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y. et al. Development of a GC–MS/MS strategy to determine 15 mycotoxins and metabolites in human urine. *Talanta*, p. 125–131, 2014.
- ROGERS, K. S. et al. **Med. Met. Bio.**, 52 (1994), 10.
- ROSSETO, R. L. et al. Análise de contaminação por aflatoxina em farinhas de 6 variedades de trigo, pelo método de ELISA. *Cultivando o Saber*, p.142-149, 2013.
- Rodrigues, P. et al. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Food microbiol*, 2009.
- SANTOS, M.C. et al. Micotoxinas e seu Potencial como Agentes de Guerra. *Rev. Virtual Quim.*, **2014**, 6 (3), 761-778. Data de publicação na Web: 17 de abril de 2014.
- SCUSSEL. V. M. *Micotoxinas em Alimentos*, 1. ed. Florianópolis: Insular, 1998.
- SHARMA, R. K.; SHARMA, S. Silica nanosphere-supported palladium(II) furfural complex as a highly efficient and recyclable catalyst for oxidative amination of aldehydes. *Dalton Trans.*, v. 43, p. 1292–1304, 2014.
- SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. *Química Nova*, v 20, p. 191-195, 1997.
- TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Quim. Nova**, Vol. 28, p. 1087-1101, 2005.
- TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. *Eletroquímica: Princípios e Aplicações* Vol. 17. Edusp, 1998.
- TRASATTI, S. 1799–1999: Alessandro Volta's ‘Electric Pile’: Two hundred years, but it doesn’t seem like it. *Journal of electroanalytical chemistry*, v. 460, n. 1, p. 1-4, 1999.
- UFSC. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Relatório 2010. Florianópolis, 2010. 17 p.
- VALIZADEH, A. Nanomaterials and Optical Diagnosis of HIV. (2015) 1–8 doi:10.3109/21691401.2015.1052469

- VALIZADEH, A. et al. Electrochemical detection of HIV-1 by nanomaterials. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 0, (2017) 000.
- VESTERGAARD, M.; KERMAN, K.; TAMIYA, E. An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors. *Sensors*, v.7, p.3442-3458, dez 2007. VALIZADEH, A. Nanomaterials and Optical Diagnosis of HIV. (2015) 1–8 doi:10.3109/21691401.2015.1052469.
- VOROBYEVA M. et al. Aptamers against immunologic targets: diagnostic and therapeutic prospects. *Nucleic acid therapeutics*. 2016; 26 (1): 52-65.
- WANG, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 17, 2005.
- WANG C. et al. An aptameric graphene nanosensor for label-free detection of small molecule biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015; 71 (1): 222-229.
- WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 2ed., Ed. Wiley-VCH, p. 28 - 39, 2001.
- WANG, J. *Analytical electrochemistry*. John Wiley & Sons, 2006.
- WANG L. et al. Graphene-based aptasensors: from molecule–interface interactions to sensor design and biomedical diagnostics. *Analyst*. 2018; 143: 1526-1543.
- WANG, X. et al. Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications. **Exp Biol Med**, v.234, p.1128-1139, 2009.
- WONG, A. **Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2010.
- YAN, M.; RAMSTRÖM, O. *Molecularly Imprinted Materials-Science and Technology*. Marcel Dekker, 2005.
- YIN, H. et al. Electrochemical oxidative determination of 4-nitrophenol based on a glassy carbon electrode modified with a hydroxyapatite nanopowder. **Microchimica Acta**, v. 169, n. 1-2, p. 87-92, 2010.
- YU, C.; LAI, Edward P. C. *Molecularly Imprinted Polymers for Ochratoxin A Extraction and Analysis*. *Toxins*, p.1536-1553, 2010.
- ZHANG X. et al. Chimeric aptamer–gelatin hydrogels as an extracellular matrix mimic for loading cells and growth factors. *Biomacromolecules*. 2016; 17(3): 778- 787.

ZHENG et al. *Mycopathologia*, v.161, p. 261–273, 2006.

ZHU, H. et al. Aptamer Based Microsphere Biosensor for Thrombin Detection. *Sensors*, v.6, p.785-795, ago 2006.