



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

*Instituto de Química - Araraquara*

**Departamento de Química Analítica**



## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

# **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES PARA AFLATOXINA B<sub>1</sub>**

**Marcos Vinicius Foguel**

**Araraquara  
2011**

**Marcos Vinicius Foguel**

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSORES PARA  
AFLATOXINA B<sub>1</sub>**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hideko Yamanaka

**Coorientador:** Dr. Antonio Ap. Pupim Ferreira

**Araraquara  
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F656d | <p>Foguel, Marcos Vinicius</p> <p>Desenvolvimento de imunossensores para aflatoxina B1 /<br/>Marcos Vinicius Foguel. – Araraquara : [s.n], 2011<br/>93 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,<br/>Instituto de Química<br/>Orientador: Hideko Yamanaka<br/>Coorientador: Antonio Aparecido Pupim Ferreira</p> <p>1. Eletroanalítica. 2. Espectroscopia de impedância<br/>eletroquímica. 3. Amperometria. 4. CDtrodo. I. Título.</p> |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

MARCOS VINÍCIUS FOGUEL

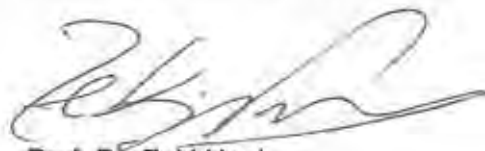
Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Química.

Araraquara, 21 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Hideko Yamanaka (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Zeki Naal  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota  
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Miguel e Fátima, a minha irmã  
Carol e a minha sobrinha Ana Flávia, pelo  
amor e apoio incondicional em todas as  
etapas e escolhas da minha vida.*

*“O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido. Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado. A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade” (Clarisse Lispector)*

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis” (Fernando Pessoa)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois o que seria de mim sem a fé que tenho Nele.

Aos meus pais, Miguel e Fátima, que com muito carinho, amor e apoio, não medem esforços para me ajudar a alcançar meus sonhos e objetivos.

A minha irmã Carol e a minha sobrinha Ana Flávia por todo apoio, carinho e amor. E pelos momentos de alegria, diversão, risos e tristezas compartilhados.

A toda a minha família que sempre com muito carinho me apóia e auxilia, em especial ao meu Avô André que sempre deu tanto amor e agora deixa tanta saudade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hideko Yamanaka pela confiança depositada, oportunidades dadas, amizade, ensinamentos profissionais e pessoais e ajuda durante todos esses 5 anos que trabalhamos juntos.

Ao Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira, meu pai científico, pela coorientação, confiança, paciência, ensinamento, amizade, incentivo, conselhos e por sempre ter uma palavra de conforto nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti que acompanhou meus projetos de perto e sempre esteve disposto a ajudar, discutir e contribuir no andamento dos trabalhos.

Aos Professores Nelson R. Stradiotto, Maria Valnice Boldrin e Maria Del Pilar T. Sotomayor pelas discussões, auxílio e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Petr Skládál pela oportunidade, atenção e profissionalismo prestado durante meu estágio no “Biosensor Group” em Brno, República Checa. Aos integrantes do grupo pela imensa ajuda e amizade: Zdenka, Karel, Zeri, Honza, Šarka, Martin, Antonin e Katká; e aos amigos de fora do laboratório por ajudarem o tempo a passar: Gabriela, Prof<sup>a</sup> Trnkova, Juliana, Guilherme, Anderson, Nayara e Michel... A todos vocês *Děkuji!*

Ao Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos amigos Glauco e Luciano, pois sei que posso contar com eles a qualquer momento e sempre estão ao meu lado. Seja para compartilhar felicidades, uma balada, uma piada, uma risada ou para dividir uma tristeza, uma lágrima.

As minhas amigas e irmãs científicas Carol Venturini e Naira, sempre dispostas a conversar, discutir, rir, brincar, compartilhar ideias e experiências, aconselhar e me ouvir.

Aos amigos Gustavo, Gabriela e Carol Rocha pela amizade, colaboração, conversas, discussões e auxílio.

Aos integrantes e amigos do grupo de eletroanalítica pela amizade, colaboração e descontração durante os cafezinhos, em especial: Dani, Thaís, Luciana, Michelle, Juliano, Thiago, Tuane, Ademar, Paim, Josiel, Fabiana, Lahys, Dani Pott e Tina.

Aos amigos Carol Rabal, Elaine, Higor e Vinicius, que começaram apenas como companheiros de academia e tornou-se uma gostosa e grande amizade.

Aos amigos que conheci durante o mestrado, pelas conversas, risadas, distrações e companheirismo, em especial: as Angels (Ju, Michele e Néia), João, Blosson, Jefferson, Wanderson, Débora, Denise, Andréia Ianuskiewtz, Ana Cristina e Rosita.

Aos amigos que fiz durante a graduação, que mesmo com a distância geográfica, ocupações diárias e contatos reduzidos, continuam nas minhas boas lembranças e no meu coração, em especial: Fer Begnini, Miller (Vareta), Raquel, Nathalie, Simone, Poliana, Alex (Michelin), Tamara, Nayara e Ana Elisa.

Aos colegas do Danúbio Azul por tornar as vindas e idas de Araraquara um momento de alegria e diversão: Tháila, Ana Flávia, Jaqueline, André, João Pedro e Feijão.

Às pessoas que me acolhem tão bem em Araraquara, desde 2005: Dona Luzia, Ivanir e Tia Luiza.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia H. Suegama pela realização e ajuda nas medidas de AFM.

Às funcionárias da Seção Técnica de Pós-Graduação e da Biblioteca por sempre estarem à disposição para ajudar, informar e tirar dúvidas.

A todos os funcionários do Instituto de Química, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química da UNESP pela infra-estrutura e acolhida durante esses anos.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

# CURRICULUM VITAE

## DADOS PESSOAIS

**Nome:** Marcos Vinicius Foguel

**Data de Nascimento:** 16 de fevereiro de 1987

**Naturalidade:** Limeira - SP

**Nacionalidade:** Brasileiro

**Estado Civil:** Solteiro

**Filiação:**

Pai - Miguel Foguel

Mãe - Rosa Fátima de Almeida Foguel

**Profissão:** Bacharel em Química

**Documento de Identidade:** 34.321.948-7 SSP/SP

**Endereço para Correspondência:**

Rua João Baptista Stábile, 49 - Jd. N. Sra. das Graças - CEP: 13845-345 - Mogi Guaçu - SP

e-mail: mvfoguel@yahoo.com.br

## FORMAÇÃO

### Básica

Ensino Fundamental: Colégio Atenas, Alfenas - MG

Ensino Médio: Colégio Integrado de Mogi Guaçu - SP

### Acadêmica

#### GRADUAÇÃO

Bacharel em Química junto ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) Araraquara-SP.

Conclusão: dezembro de 2008.

Iniciação Científica realizada junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNESP - Araraquara-SP, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hideko Yamanaka.

Projetos:

1. “Modificação e caracterização de CDtrodo de ouro com monocamada de tiol e proteína de *Trypanossoma. cruzi*” de outubro de 2007 a outubro de 2008. Bolsa concedida pela FAPESP (Processo nº 2007/04227-9).
2. “Imobilização da proteína estreptavidina em matrizes híbridas orgânicas-inorgânicas preparadas por processo sol-gel” de setembro de 2006 a setembro de 2007. Bolsa concedida pela CNPq/PIBIC.

#### PÓS-GRADUAÇÃO

Mestrado em Química junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) Araraquara-SP, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hideko Yamanaka e coorientação do Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira.

Conclusão: junho de 2011.

#### Projetos:

1. “Desenvolvimento de imunossensores para Aflatoxina B<sub>1</sub>” de março de 2009 a junho de 2011. Bolsa concedida pela Fapesp (Processo nº. 2008/07729-8).
2. Estágio no laboratório do “Biosensor Group” chefiado pelo Prof. Petr Skadal no Departamento de Bioquímica da “Masaryk University” em Brno, República Tcheca, de 31 de maio a 30 de setembro de 2010. Bolsa concedida pelo 7<sup>th</sup> Frame Program IRSES (PIRSES-GA-2008-230849)

#### DISCIPLINAS CURSADAS NA PÓS-GRADUAÇÃO

| Disciplinas cursadas                                                                                                                                         | Créditos | Carga Horária | Frequência | Conceito |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------|------------|----------|
| Metrologia em química e qualidade                                                                                                                            | 12       | 180           | 100        | A        |
| Técnicas eletroanalíticas II                                                                                                                                 | 12       | 180           | 100        | A        |
| Métodos potenciométricos e espectrofotométricos aplicados à análise de substâncias orgânicas de importância nutricional em medicamentos, bebidas e alimentos | 12       | 180           | 93         | A        |
| Biossensores                                                                                                                                                 | 08       | 180           | 100        | A        |
| Tópico Especiais: Receptores e transdutores: Biossensores                                                                                                    | 05       | 75            | 100        | A        |
| Seminários Gerais                                                                                                                                            | 05       |               |            |          |

#### TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. GIORDANO, G. F.; GARBELLINI, G. S.; FOGUEL, M. V.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; YAMANAKA, H. *Imobilização de anticorpo anti-aflatoxina B<sub>1</sub> sobre eletrodos compósitos de grafite-epóxi contendo nanopartículas de ouro*. In: **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Florianópolis - SP, 23 a 26 de maio de 2011.
2. SANTOS, G. P.; FOGUEL, M. V.; GARBELLINI, G. S.; FERREIRA, A. A. P.; SKLADAL, P.; MASCINI, M.; YAMANAKA, H. *Immobilization of Oligopeptides on Gold CDtrode for the Development of Biomimetic Sensor for Pesticides*. In: **The 9th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry**, Turku - Finlândia, 08 a 11 de maio de 2011.
3. FOGUEL, M. V.; FERREIRA, A. A. P.; BENEDETTI, A. V.; SKLADAL, P.; MASCINI, M.; YAMANAKA, H. *Electrochemical Impedance Spectroscopy on Gold CDtrode Modified with p-ATP for Aflatoxin B<sub>1</sub> Immunosensor Development*. In: **20th World Congress on Biosensors**, Glasgow - UK, 26 a 28 de maio de 2010.
4. FOGUEL, M. V.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V.; FERREIRA, A. A. P. *Impedância eletroquímica sobre CDtrodo de ouro modificado com SAM e anticorpo anti-aflatoxina B<sub>1</sub>*. In: **17º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, Araraquara - SP, 18 a 20 de outubro de 2009.

5. FOGUEL, M. V.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. *Amperometric immunosensor using gold CDtrodes and Tc85 protein from Trypanosoma cruzi*. In: **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP)**, Ribeirão Preto - SP, 06 a 09 de setembro de 2009.
6. FOGUEL, M. V.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V.; FERREIRA, A. A. P. *CDtrodo de ouro modificado com SAM de 4-(metilmercaptop)benzaldeído no desenvolvimento de imunossensor*. In: **6th Ibero-American Congress on Sensors (IBERSENSOR)**, São Paulo - SP, 24 a 26 de novembro de 2008.
7. FOGUEL, M. V.; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. A. P. *Preparação de CDtrodos de ouro e modificação com SAM de 4-(metilmercaptop)benzaldeído*. In: **XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, São José dos Campos - SP, 29 a 30 de outubro de 2008.
8. FOGUEL, M. V.; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. A. P. *Construção e modificações do CDtrodo de ouro no desenvolvimento de imunossensor*. In: **XXXVIII Semana da Química**, Araraquara - SP, 09 de outubro de 2008.
9. FOGUEL, M. V.; FERREIRA, A. A. P.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. *Investigações sobre o comportamento enzimático da peroxidase (HRP) imobilizada diretamente sobre grafite*. In: **16º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti**, Franca - SP, 13 a 14 de novembro de 2007.
10. FOGUEL, M. V.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V.; FERREIRA, A. A. P. *Eletrodo de grafite modificado com enzima HRP para o estudo voltamétrico de pulso diferencial*. In: **XIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2007, Presidente Prudente - SP, 22 a 23 de outubro de 2007.

## PUBLICAÇÕES

1. FOGUEL, M. V.; SANTOS, G. P.; FERREIRA, A. A. P., YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. *Amperometric immunosensor for Chagas disease using CD-R gold transducer* (Submetido). **Electroanalysis**, 2011.
2. FOGUEL, M. V.; ULIANA, C. V.; TOMAZ, P. R. U.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. A. P. Avaliação da limpeza de CDtrodo construídos a partir de CD de ouro gravável/fita adesiva de galvanoplastia. **Eclética Química** (Araraquara), v. 34, n. 2, p. 59 - 66, 2009.

## PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. 20<sup>th</sup> World Congress on Biosensors, Glasgow - UK, 26 a 28 de maio de 2010.
2. 17º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, Araraquara - SP, 18 a 20 de outubro de 2009.
3. 7<sup>th</sup> International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), Ribeirão Preto - SP, 06 a 09 de setembro de 2009.
4. Workshop Nacional sobre Biossensores, Araraquara - SP, 08 a 09 de outubro de 2009.

5. 6<sup>th</sup> Ibero-American Congress on Sensors (IBERSENSOR), São Paulo - SP, 24 a 26 de novembro de 2008.
6. XX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, São José dos Campos - SP, 29 e 30 de outubro de 2008.
7. XXXVIII Semana da Química, Araraquara - SP, 09 de outubro de 2008.
8. IV Comemoração do Dia do Químico, Araraquara - SP, 18 de junho de 2008
9. 16º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, Franca - SP, 13 e 14 de novembro de 2007.
10. XIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2007, Presidente Prudente - SP, 22 e 23 de outubro de 2007.
11. III Comemoração Dia do Químico, Araraquara - SP, 18 de junho de 2007.
12. VI TEJ - Treinamento Empresarial Júnior, Araraquara - SP, 25 de agosto de 2007.
13. XXXVII Semana da Química, Araraquara - SP, 23 a 28 de setembro de 2007.
14. XXXVI Semana da Química, Araraquara - SP, 25 a 29 de setembro de 2006.
15. II Comemoração Dia do Químico, Araraquara - SP, 21 de junho de 2006.
16. V TEJ - Treinamento Empresarial Júnior, Araraquara - SP, 26 de agosto de 2006.
17. XXXV Semana da Química, Araraquara - SP, 16 a 21 de outubro de 2005.
18. I Comemoração Dia do Químico, Araraquara - SP, 21 de junho de 2005.
19. IV TEJ - Treinamento Empresarial Júnior, Araraquara - SP, 12 de outubro de 2005.

#### **ATIVIDADES EXTRACURRICULARES**

1. Membro da comissão organizadora dos seguintes eventos: 17º Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti, Araraquara - SP, 18 a 20 de outubro de 2009; Workshop Nacional sobre Biossensores, Araraquara - SP, 08 e 09 de outubro de 2009; IV Comemoração do Dia do Químico, Araraquara - SP, 18 de junho de 2008; III Comemoração do Dia do Químico, Araraquara - SP, 18 de junho de 2007; II Comemoração do Dia do Químico, Araraquara - SP, 21 de junho de 2006.
2. Participação da Química Júnior Projetos e Consultorias, Empresa Júnior do Instituto de Química da UNESP - Araraquara, nos seguintes cargos: Gerente de Projetos (Gestão 2005/2006), Gerente de Marketing (Gestão 2006/2007), Gerente de Recursos Humanos (Gestão 2007/2008).

## RESUMO

Muitas espécies de fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp. são capazes de contaminar e produzir micotoxinas em grãos e cereais, sendo responsáveis por doenças em animais e humanos. As espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são produtoras das aflatoxinas, que têm recebido grande atenção, devido a seus efeitos tóxicos no organismo como carcinogenicidade e mutagenicidade. Dentre os diversos tipos de aflatoxinas, destaca-se a aflatoxina B<sub>1</sub>, devido à alta potencialidade tóxica. Várias técnicas têm sido aplicadas na detecção desta toxina e o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos tem sido uma alternativa, devido à simplicidade, especificidade e alta sensibilidade. Superfícies metálicas de ouro, como CD-Rs de ouro (Au-CDtrodos), têm sido amplamente utilizadas como transdutores para a construção de imunossensores, devido à capacidade de imobilizar moléculas biológicas na presença ou ausência de monocamadas auto-organizadas (“self-assembled monolayers” - SAM).

O presente trabalho relata o desenvolvimento de imunossensores, amperométrico e impedimétrico, para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> em alimentos empregando CDtrodos de ouro. As etapas de construção dos imunossensores incluem as modificações do transdutor de ouro com p-aminotiofenol (p-ATP), proteína A ou ácido lipóico, seguido da imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> e imunoenaios com o antígeno (AFB<sub>1</sub>).

Empregando técnicas eletroquímicas (espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica) definiu-se que a SAM de ácido lipóico ativada com EDC/NHS foi o modificador que apresentou maior eficiência para a imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>. A partir de estudos quimiométricos, por meio do planejamento fatorial completo, definiram-se as melhores condições para o desenvolvimento do imunossensor: anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> na diluição 1:2000 e bloqueio da superfície com soroalbumina bovina 0,5%, ambos com incubação de 1 hora e imunorreação anticorpo-antígeno AFB<sub>1</sub> durante 30 minutos. O imunossensor impedimétrico foi empregado na análise de amostras de amendoim, apresentando resultados satisfatórios.

Estudos preliminares para o desenvolvimento do imunossensor amperométrico foram realizados estudando-se diferentes diluições do anticorpo conjugado com a enzima peroxidase (HRP). O monitoramento foi realizado juntamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), substrato e mediador da reação enzimática, respectivamente.

## ABSTRACT

Many fungi species belonging to the genus *Aspergillus* sp. are able to infect and produce mycotoxins in grains and cereals, they are responsible for diseases in animals and humans. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* are producers of aflatoxina, which have received great attention, due to toxic effects on the organism, such as carcinogenicity and mutagenicity. Among the different types of aflatoxins, aflatoxina B<sub>1</sub> stands out due to high toxic potential. Several techniques have been applied in the detection of this toxin and the development of electrochemical immunosensors has been an option due to simplicity, specificity and high sensitivity. Metallic surfaces of gold, as gold CD-R (Au-CDtrodes), have been widely used as transducers for construction of immunosensors, due to the ability to immobilize biological molecules in presence or absence of self-assembled monolayers (SAM).

This work describes the development of immunosensors, amperometric and impedimetric, for aflatoxin B<sub>1</sub> detection in foods using gold CDtrodes. The construction steps of the immunosensors include modifications of the gold transducer with p-aminothiophenol (p-ATP), protein A or lipoic acid, followed by anti-AFB<sub>1</sub> immobilization and immunoassays with antigen (AFB<sub>1</sub>).

Employing electrochemical techniques (electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry) was defined that the lipoic acid SAM activated with EDC/NHS was the modifier with the highest efficiency for the anti-AFB<sub>1</sub> antibody immobilization. Using chemometric studies, through the full factorial design, was defined the best conditions for the immunosensor development: anti-AFB<sub>1</sub> antibody at 1:2000 dilution and surface blocking with 0.5% bovine serum albumin, both with incubation 1 hour and antibody- AFB<sub>1</sub> antigen immunoreaction for 30 minutes. The impedimetric immunosensor was employed to analyze peanut samples with satisfactory results.

Preliminary studies for the development of amperometric immunosensor were performed by studying different dilutions of antibody conjugated with peroxidase (HRP) dilution. The monitoring was conducted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 5-aminosalicylic acid (5-ASA), substrate and mediator of the enzymatic reaction, respectively.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Imagem de microscopia do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                       | 23 |
| <b>Figura 2.</b> Estruturas das aflatoxinas: aflatoxina B <sub>1</sub> (AFB <sub>1</sub> ), B <sub>2</sub> (AFB <sub>2</sub> ), G <sub>1</sub> (AFG <sub>1</sub> ), G <sub>2</sub> (AFG <sub>2</sub> ), M <sub>1</sub> (AFM <sub>1</sub> ) e M <sub>2</sub> (AFM <sub>2</sub> ).                                                                  | 24 |
| <b>Figura 3.</b> Representação do anticorpo e suas regiões.                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 28 |
| <b>Figura 4.</b> Estrutura do p-aminotiofenol (A) e do ácido lipóico (B).                                                                                                                                                                                                                                                                         | 29 |
| <b>Figura 5.</b> Representação de um diagrama de Nyquist com as principais características de um diagrama de impedância.                                                                                                                                                                                                                          | 31 |
| <b>Figura 6.</b> Confeção de CDtrodos: I) área recortada do CD; II) delimitação da área do eletrodo empregando fita de galvanoplastia; III) contato elétrico revestido com fita de teflon.                                                                                                                                                        | 36 |
| <b>Figura 7.</b> Representação da superfície de ouro do CDtrodo modificada com p-ATP (A) e com ácido lipóico (B).                                                                                                                                                                                                                                 | 37 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema da câmara úmida                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 37 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema das áreas cortadas do CD de ouro: Borda Interna (1), Meio do CD (2) e Borda Externa (3).                                                                                                                                                                                                                                 | 42 |
| <b>Figura 10.</b> Voltamograma cíclico do Au-CDtrodo antes de qualquer pré-tratamento, em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 na presença de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> vs Ag AgCl KCl <sub>(sat)</sub> ; v = 50 mV s <sup>-1</sup> .                                        | 44 |
| <b>Figura 11.</b> Voltamograma cíclico em solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> do Au-CDtrodo vs Ag AgCl KCl <sub>(sat)</sub> ; v = 100 mV s <sup>-1</sup> .                                                                                                                                                          | 45 |
| <b>Figura 12.</b> Voltamograma cíclico em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 na presença de Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> antes (—) e após (—) o pré-tratamento do Au-CDtrodo com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> vs Ag AgCl KCl <sub>(sat)</sub> ; v = 50 mV s <sup>-1</sup> . | 45 |
| <b>Figura 13.</b> Imagens de AFM da superfície de ouro da borda externa do CD Inkjet: (A) 10×10, (B) imagem em 3D 10×10, (C) 3×3, (D) imagem em 3D 3×3 μm <sup>2</sup> .                                                                                                                                                                          | 46 |
| <b>Figura 14.</b> Imagens de AFM da superfície de ouro da borda interna do CD Arquivé: (A) 10×10, (B) imagem em 3D 10×10, (C) 3×3, (D) imagem em 3D 3×3 μm <sup>2</sup> .                                                                                                                                                                         | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Imagens de AFM da superfície de ouro do meio (A-D) e da borda externa (E-H) do CD Arquivé: (A, E) 10×10, (B,F) imagem em 3D 10×10, (C,G) 3×3, (D, H) imagem em 3D 3×3 μm <sup>2</sup> .                                                                                                                                         | 48 |
| <b>Figura 16.</b> Imagens de AFM da superfície de ouro da borda interna do CD MAM-A: (A) 10×10, (B) imagem em 3D 10×10, (C) 3×3, (D) imagem em 3D 3×3 μm <sup>2</sup> .                                                                                                                                                                           | 49 |
| <b>Figura 17.</b> Imagens de AFM da superfície de ouro do meio (A-D) e da borda externa (E-H) do CD MAM-A: (A, E) 10×10, (B,F) imagem em 3D 10×10, (C,G) 3×3, (D, H) imagem em 3D 3×3 μm <sup>2</sup> .                                                                                                                                           | 50 |

- Figura 18.** Voltamogramas cíclicos em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do CDtrodo de ouro sem modificação (—) e do CDtrodo modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  com 15 (—) e 30 (—) min de incubação vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 52
- Figura 19.** Voltamogramas cíclicos em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  dos CDtrodos de ouro sem modificação: Eletrodo 1 (—), Eletrodo 2 (—) e Eletrodo 3 (—); e dos CDtrodos modificados com p-ATP com 30 minutos de incubação, nas seguintes concentrações:  $1 \times 10^{-3}$  (A),  $2 \times 10^{-3}$  (B),  $1 \times 10^{-2}$  (C),  $2 \times 10^{-2}$  (D),  $2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  (E): Eletrodo 1 (—), Eletrodo 2 (—) e Eletrodo 3 (—) vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 53
- Figura 20.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 contendo p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  do CDtrodo de ouro sem modificação, sendo: (—) 1º ciclo, (—) 2º ciclo e (—) 10º ciclo vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 54
- Figura 21.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 do CDtrodo de ouro sem modificação (—) e modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  (—) com intervalo de potencial de  $-0,4$  a  $+0,7 \text{ V}$  vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 55
- Figura 22.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 do CDtrodo de ouro sem modificação (—) e modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  (—), com intervalo de potencial de  $+0,7$  a  $-0,4 \text{ V}$  vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 55
- Figura 23.** Curva de potencial de circuito aberto *versus* tempo obtida para um CDtrodo sem modificação em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ . ..... 56
- Figura 24.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo modificados com ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com diferentes valores de amplitude de perturbação: 5 (■ e ●), 10 (▲ e ▼) e 15 mV (◆ e ▼) vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ . Inset: módulo de impedância na frequência de 133 mHz vs amplitude (“rms”) / mV ..... 57
- Figura 25.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo sem modificação com intervalo de frequência de 100 kHz a 10 mHz vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ . ..... 58
- Figura 26.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo sem modificação com intervalo de frequência de 100 kHz a 100 mHz vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ . ..... 58
- Figura 27.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo sem modificação (■) e modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  com 30 (●), 60 (▲) e 120 min (▼) de incubação vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ... 59
- Figura 28.** Ampliação da região de altas frequências da Figura 27. .... 60
- Figura 29.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo sem modificação (■) e modificado com p-ATP

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 x 10 <sup>-1</sup> (●); 2 x 10 <sup>-1</sup> (▲); 1 x 10 <sup>-2</sup> (▼); 2 x 10 <sup>-2</sup> (●) e 2 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> (▼) com 60 de incubação vs AgI/AgCl/KCl <sub>(sat)</sub> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 61 |
| <b>Figura 30.</b> Ampliação da região de altas frequências da Figura 29. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 61 |
| <b>Figura 31.</b> Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), CDtrodo modificado com p-ATP 2 x 10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> (●) e com o anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM com tempos de incubação de 1 (▲), 3 (▼), 12 (□) e 18 h (○) vs AgI/AgCl/KCl <sub>(sat)</sub> .....                                                                                                                              | 62 |
| <b>Figura 32.</b> Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> do CDtrodo sem modificação (—), modificado com p-ATP 2 x 10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> (—) e com o anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM com tempos de incubação de 1 (—), 6 (—), 10 (—), 12 (—) e 18 h (—) vs AgI/AgCl/KCl <sub>(sat)</sub> .....                                                                                                                                    | 63 |
| <b>Figura 33.</b> Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> do CDtrodo sem modificação (—), modificado com p-ATP 2 x 10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> (—) e com o anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> + EDC 1 x 10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup> imobilizado sobre a SAM com 3 h de incubação (—) vs AgI/AgCl/KCl <sub>(sat)</sub> .....                                                                                                                               | 64 |
| <b>Figura 34.</b> Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), modificado com ácido lipóico 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> (●); com o grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (▲), com a proteína A 0,1 mg mL <sup>-1</sup> imobilizada sobre a SAM ativada com tempo de incubação de 3 h (▼) e com a proteína A 0,1 mg mL <sup>-1</sup> imobilizada diretamente sobre o CDtrodo com tempo de incubação de 3 h (◆). .... | 65 |
| <b>Figura 35.</b> Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> para CDtrodo modificado somente com a proteína A 0,1 mg mL <sup>-1</sup> sobre o ouro (■), e para os CDtrodos modificados com a proteína A com adição de solução tampão 0,01 mol L <sup>-1</sup> pH 7,4 por 12 h (●), adição do antígeno AFB <sub>1</sub> 1 x 10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> por 12 h (▲) e com adição de Ac-AFB <sub>1</sub> 1:2000 por 12 h (▼).....                               | 66 |
| <b>Figura 36.</b> Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> do CDtrodo sem modificação (—), modificado com ácido lipóico 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> (—), com o grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (—) e o anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM ativada com 2 h de incubação (—) vs AgI/AgCl/KCl <sub>(sat)</sub> .....                                                                                                          | 68 |
| <b>Figura 37.</b> Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-/4-</sup> 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), modificado com ácido lipóico 1 x 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> (●), com o grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (▲) e com o anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM ativada com 2h de incubação (▼) vs AgI/AgCl/KCl <sub>(sat)</sub> .....                                                                                                 | 69 |
| <b>Figura 38.</b> Gráfico da impedância em um plano complexo de um sistema eletroquímico simples <sup>64</sup> ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 70 |

- Figura 39.** Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do Ac-AFB<sub>1</sub> sobre CDtrodo de ouro modificado com SAM. D<sub>Ac</sub> = diluição do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> e t<sub>incub.</sub> = tempo de incubação..... 71
- Figura 40.** Tendência da resistência para os níveis alto e baixo de cada variável..... 71
- Figura 41.** Imagens de FE-SEM para a superfície de ouro sem modificação (A) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM de ácido lipóico (B) com ampliação de 5.000 × e superfície sem modificação (C) e com o anticorpo imobilizado (D) com ampliação de 10.000 ×..... 73
- Figura 42.** Imagens de AFM do CDtrodo sem modificação (A, B, E, F) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizada sobre SAM de ácido lipóico (B, C, G, H): (A, C) 5×5 μm<sup>2</sup>, (B,D) imagem em 3D 5×15 μm<sup>2</sup>, (E, G) 3×3 μm<sup>2</sup>, (F, H) imagem em 3D 3×3 μm<sup>2</sup>. .... 74
- Figura 43.** Esquema da interação do anticorpo anti-aflatoxina B<sub>1</sub> com uma molécula de aflatoxina B<sub>1</sub>. .... 75
- Figura 44.** Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do antígeno AFB<sub>1</sub> sobre o anticorpo imobilizado sobre a SAM do CDtrodo de ouro. C<sub>BSA</sub> = concentração de soroalbumina bovina; C<sub>AFB1</sub> = concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> e t<sub>incub.</sub> = tempo de incubação da aflatoxina B<sub>1</sub>. .... 76
- Figura 45.** Tendência da resistência para os níveis alto e baixo de cada variável. C<sub>BSA</sub> = concentração de soroalbumina bovina; C<sub>AFB1</sub> = concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> e t<sub>incub.</sub> = tempo de incubação da aflatoxina B<sub>1</sub>. .... 77
- Figura 46.** Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do antígeno AFB<sub>1</sub> sobre o anticorpo imobilizado sobre a SAM do CDtrodo de ouro. C<sub>BSA</sub> = concentração de soroalbumina bovina; C<sub>AFB1</sub> = concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> e t<sub>incub.</sub> = tempo de incubação da aflatoxina B<sub>1</sub>. .... 78
- Figura 47.** Tendência da resistência para os níveis alto e baixo de cada variável. C<sub>BSA</sub> = concentração de soroalbumina bovina; C<sub>AFB1</sub> = concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> e t<sub>incub.</sub> = tempo de incubação da aflatoxina B<sub>1</sub>. .... 79
- Figura 48.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), CDtrodo modificado com ácido lipóico 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (●), grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (▲), anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> 1:2000 imobilizado sobre a SAM com 1h de incubação (▼), Ac imobilizado e bloqueado com BSA 0,5% com 30 min de incubação (◆) e CDtrodo com AFB<sub>1</sub> 1 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> sobre o Ac com 30 min de incubação (▼) vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>..... 80
- Figura 49.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), CDtrodo modificado com ácido lipóico 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (●), grupo carboxílico da SAM com EDC/NHS (▲), anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> 1:2000 imobilizado sobre a SAM ativada com 1h de incubação (▼),

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Ac imobilizado e bloqueado com BSA 0,5% com (A) 30, (B) 40 e (C) 60 min de incubação (♦) e CDtrodo com AFB <sub>1</sub> 1 x 10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> sobre o Ac com 30 minutos de incubação (▼) vs Ag AgCl KCl <sub>(sat)</sub> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 81 |
| <b>Figura 50.</b> Curva analítica da concentração de aflatoxina B <sub>1</sub> do imunossensor impedimétrico. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 82 |
| <b>Figura 51.</b> Interação do anticorpo e do anticorpo marcado com a molécula de AFB <sub>1</sub> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 83 |
| <b>Figura 52.</b> Voltamogramas lineares dos CDtrodos modificados com SAM, Ac, BSA, Ag e Ac* e em solução de tampão citrato-fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 5,0 (—), em solução tampão + 5-ASA (—), em solução tampão + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (—), solução tampão + 5-ASA /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (—) e CDtrodos modificados com SAM, Ac, BSA em solução tampão + 5-ASA/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (—) vs Ag AgCl KCl <sub>(sat)</sub> ; v = 50 mV s <sup>-1</sup> . Inbox: E ampliação da região de corrente entre +0,5 e -4,0 μA..... | 84 |
| <b>Figura 53.</b> Efeito da diluição do anticorpo conjugado com a enzima peroxidase.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 85 |
| <b>Figura 54.</b> Curva analítica da concentração de aflatoxina B <sub>1</sub> do imunossensor amperométrico para o intervalo de 5 x 10 <sup>-10</sup> a 1 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 85 |
| <b>Figura 55.</b> Curva analítica da concentração de aflatoxina B <sub>1</sub> do imunossensor amperométrico para o intervalo de 5 x 10 <sup>-8</sup> a 1 x 10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 86 |

## LISTA DE ESQUEMAS

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Esquema 1.</b> Fluxograma da extração da aflatoxina B <sub>1</sub> em amostras de alimentos.....                                              | 40 |
| <b>Esquema 2.</b> Reação de acoplamento da do anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> a SAM de ácido lipóico por meio da EDC/NHS <sup>58, 60</sup> ..... | 67 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Limites máximos tolerados de aflatoxina em alimentos segundo portaria da ANVISA publicada em 22/02/2011. .... | 27 |
| <b>Tabela 2.</b> Matriz de planejamento fatorial completo de duas variáveis e dois níveis .....                                | 39 |
| <b>Tabela 3.</b> Matriz de planejamento fatorial completo de três variáveis e dois níveis .....                                | 39 |
| <b>Tabela 4.</b> Propriedades eletroquímicas dos CD-Rs. ....                                                                   | 42 |
| <b>Tabela 5.</b> Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para cada região do CD Inkjet.....                               | 46 |
| <b>Tabela 6.</b> Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para cada região do CD Archive.....                              | 49 |
| <b>Tabela 7.</b> Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para cada região do CD MAM-A.....                                | 51 |
| <b>Tabela 8.</b> Matriz de planejamento fatorial completo $2^2$ e resistências de transferência de carga.....                  | 70 |
| <b>Tabela 9.</b> Matriz de planejamento fatorial completo $2^3$ e resistências de transferência de carga.....                  | 76 |
| <b>Tabela 10.</b> Matriz de planejamento fatorial completo $2^3$ e resistências de transferência de carga.....                 | 78 |
| <b>Tabela 11.</b> Valores de concentração de AFB <sub>1</sub> encontrados em amostras de amendoim. ....                        | 82 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB<sub>1</sub>: aflatoxina B<sub>1</sub>  
AFB<sub>2</sub>: aflatoxina B<sub>2</sub>  
AFG<sub>1</sub>: aflatoxina G<sub>1</sub>  
AFG<sub>2</sub>: aflatoxina G<sub>2</sub>  
AFM<sub>1</sub>: aflatoxina M<sub>1</sub>  
AFM<sub>2</sub>: aflatoxina M<sub>2</sub>  
CD-R: disco compacto gravável  
SAM: monocamada auto-organizada  
Ac: anticorpo  
Ag: antígeno  
Ac\*: anticorpo marcado  
HRP: horseradish peroxidase  
p-ATP: para-aminotiofenol  
BSA: soroalbumina bovina  
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida  
NHS: N-hidroxi-succinamida  
5-ASA: ácido 5-aminossalicílico  
EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica  
Z<sub>re</sub>: impedância real  
Z<sub>im</sub>: impedância imaginária  
R<sub>Ω</sub>: resistência da solução  
R<sub>ct</sub>: resistência de transferência de carga  
E<sub>OC</sub>: potencial de circuito aberto  
rms: root mean square  
AFM: microscopia de força atômica  
FE-SEM: microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão  
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
IARC: International Agency of Research on Cancer  
LMT: limites máximos tolerados  
CCD: cromatografia de camada delgada  
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência  
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay  
SPE: screen printed electrode  
PTFE: politetrafluoretileno  
OTA: ocratoxina A  
DON: desoxinivalenol  
FB<sub>1</sub>: fumosina B<sub>1</sub>  
FB<sub>2</sub>: fumosina B<sub>2</sub>  
PAT: patulina  
ZON: zerralenona  
TMB: tetrametilbenzidina

## SUMÁRIO

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                      | <b>23</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                                        | <b>33</b> |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                              | <b>34</b> |
| 3.1 Reagentes e soluções .....                                                                  | 34        |
| 3.2 Equipamentos e célula eletroquímica .....                                                   | 35        |
| 3.3 Construção de eletrodos de ouro (CDtrodos) .....                                            | 35        |
| 3.4 Modificação da superfície de ouro do CDtrodo.....                                           | 36        |
| 3.4.1 Modificação com p-ATP.....                                                                | 37        |
| 3.4.2 Modificação com proteína A.....                                                           | 37        |
| 3.4.3 Modificação com ácido lipóico.....                                                        | 38        |
| 3.5 Imobilização do anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> .....                                       | 38        |
| 3.5.1 SAM p-ATP - anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> .....                                         | 38        |
| 3.5.2 Proteína A - anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> .....                                        | 38        |
| 3.5.3 SAM ácido lipóico - anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> .....                                 | 38        |
| 3.6 Otimização da solução bloqueio e das condições para a reação imunoenzimática Ac-Ag.....     | 39        |
| 3.7 Imobilização do anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> conjugado com a enzima HRP .....            | 39        |
| 3.8 Processo de extração da AFB <sub>1</sub> em amostras de amendoim .....                      | 39        |
| 3.9 Condições empregadas para os estudos voltamétricos .....                                    | 41        |
| 3.10 Condições empregadas para os estudos de EIS .....                                          | 41        |
| 3.11 Monitoramento amperométrico .....                                                          | 41        |
| 3.12 Imagens de microscopia de força atômica da superfície de ouro do CD-R.....                 | 41        |
| 3.12.1 Estudo das superfícies sem modificação.....                                              | 41        |
| 3.12.2 Estudo das superfícies com o anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> imobilizado sobre SAM ..... | 42        |
| 3.13 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (FE-SEM) da superfície de ouro do CD-R..... | 43        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>                                                          | <b>44</b> |
| 4.1. Limpeza da superfície dos CDtrodos de ouro.....                                            | 44        |

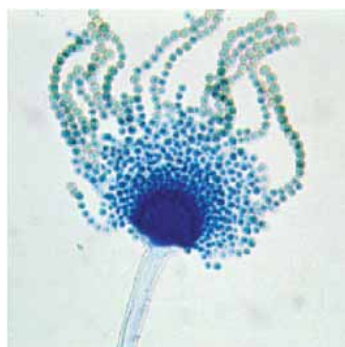
|                                                                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2 Caracterização através de AFM da superfície de ouro sem modificação de 3 diferentes tipos de CD-R .....                                                   | 46        |
| 4.3 Estudo do tempo de incubação e concentração da solução de p-ATP para a formação da SAM sobre a superfície do CDtrodo empregando voltametria cíclica ..... | 51        |
| 4.4 Comportamento eletroquímico do p-ATP em solução e modificado na superfície do CDtrodo .....                                                               | 54        |
| 4.5 Otimização dos parâmetros a serem empregados nas medidas de EIS.....                                                                                      | 56        |
| 4.6 Estudos das melhores condições para a formação da SAM de p-ATP.....                                                                                       | 59        |
| 4.7 Imobilização do anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> sobre a SAM de p-ATP .....                                                                                | 62        |
| 4.8 Investigação da imobilização da proteína A sobre a superfície de ouro.....                                                                                | 64        |
| 4.9 Imobilização do anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> sobre a SAM de ácido lipóico .....                                                                        | 66        |
| 4.10 Estudo quimiométrico da concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> sobre SAM de ácido lipóico.....                             | 69        |
| 4.11 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (FE-SEM) da superfície de ouro com o Ac imobilizado.....                                                  | 72        |
| 4.12 Imagens de microscopia de força atômica (AFM) do CDtrodo com o Ac imobilizado .....                                                                      | 72        |
| 4.13 Estudo quimiométrico da concentração de BSA, AFB <sub>1</sub> e tempo de incubação do antígeno.....                                                      | 75        |
| 4.14 Curva analítica do imunossensor impedimétrico.....                                                                                                       | 81        |
| 4.15 Aplicação do imunossensor impedimétrico em amostras de amendoim .....                                                                                    | 82        |
| 4.16 Estudos preliminares do desenvolvimento do imunossensor amperométrico .....                                                                              | 83        |
| <b>5. CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                                                     | <b>87</b> |
| <b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>                                                                                                                           | <b>88</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                      | <b>89</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, onde são capazes de contaminar e crescer em muitos tipos de alimentos, por apresentarem nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídeos, que constituem um substrato adequado para o desenvolvimento de microrganismos<sup>1</sup>. Geralmente a presença dos fungos é acompanhada por alterações na textura, odor e sabor dos alimentos contaminados, devido à presença de enzimas e compostos voláteis eliminados pelo fungo. Em alguns casos, essas mudanças são desejáveis, como na utilização das cepas não-tóxicas de *Penicillium roqueforti* para a produção de queijo de mofo azul. No entanto, na maioria das vezes, a contaminação fúngica leva à deterioração dos alimentos, como alteração do sabor, descoloração, podridão e desintegração da estrutura do alimento<sup>2</sup>.

Fungos micotoxinogênicos desempenham um papel importante na deterioração da qualidade comercial e à higiene dos gêneros alimentícios, por sintetizar metabólitos secundários altamente tóxicos conhecidos como micotoxinas. Dentre esses fungos, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium sp.* são os mais presentes na cultura alimentar, pois podem contaminar no campo, na colheita, após a colheita e durante o armazenamento<sup>3</sup>. Seis classes de micotoxinas são frequentemente encontradas como contaminantes de alimentos: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, patulina, tricotecenos e zearalenona<sup>4</sup>.

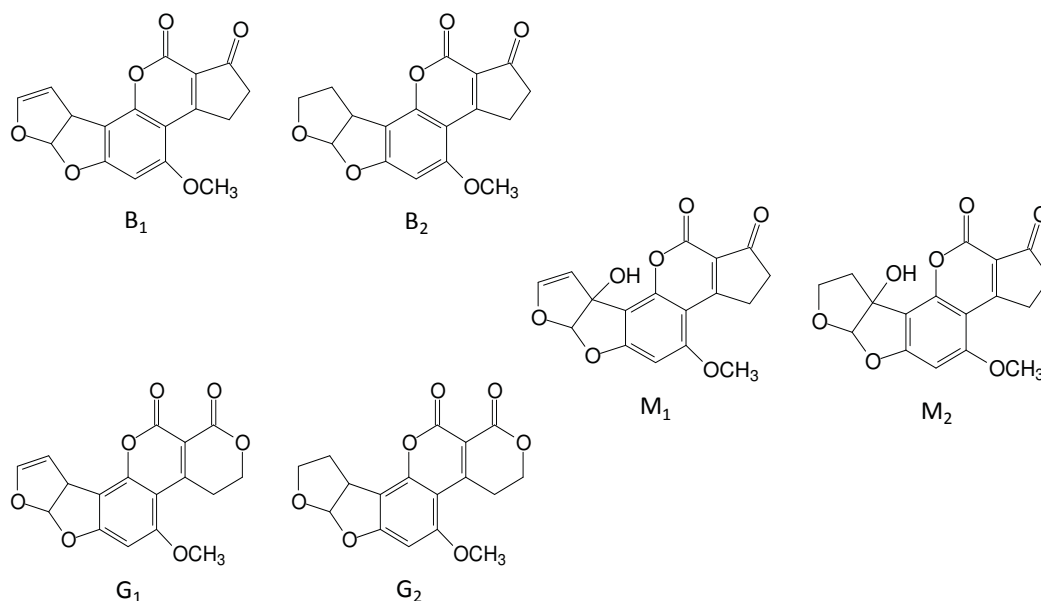
O *Aspergilli* é um gênero amplo e diversificado de fungos filamentosos<sup>5</sup>. Os dois principais fungos pertencentes a esse gênero são o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus*, que secretam aflatoxinas<sup>6</sup>. A Figura 1 apresenta uma micrografia do fungo *A. flavus*<sup>7</sup>.



**Figura 1.** Imagem de microscopia do fungo *Aspergillus flavus*.

Estes fungos podem crescer e produzir metabólitos tóxicos, contaminando uma ampla gama de produtos agrícolas<sup>8</sup>. Na figura 2 são apresentadas as estruturas moleculares das quatro aflatoxinas que ocorrem naturalmente ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  e  $G_2$ ) e os dois bioprodutos ( $M_1$  e

M<sub>2</sub>), que são metabolizados e excretados no leite pelos animais que consumiram alimentos contaminados por aflatoxinas<sup>9</sup>.



**Figura 2.** Estruturas das aflatoxinas: aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e M<sub>2</sub> (AFM<sub>2</sub>).

O nome “aflatoxina” é derivado da primeira letra de *Aspergillus* e das três primeiras letras de *flavus*. Estruturalmente, as aflatoxinas são derivados difurocumarinos que apresentam fluorescência sob luz ultravioleta e são classificadas de acordo com a cor da fluorescência: B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para a cor azul (“blue”) e G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> para a verde (“green”). Já as aflatoxinas M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> recebem essa nomenclatura por serem encontradas no leite (“milk”)<sup>10</sup>.

As aflatoxinas foram descobertas no início da década de 60, após o acidente econômico ocorrido na Inglaterra, onde, em poucas semanas, cem mil filhotes de perus e outros milhares de filhotes de outros tipos de aves morreram de forma misteriosa. Inicialmente atribuíram as mortes devido à “Doença X do peru”, descobrindo-se posteriormente que os animais sofreram de uma hepatite aguda necrosante após a ingestão de ração à base de amendoim contaminado<sup>11</sup>.

Os principais produtos alimentícios sujeitos à contaminação com aflatoxinas são: amendoim (cru, torrado, creme, em doce e confeitado), milho (pipoca, canjica e grãos), trigo, arroz, castanha do Pará, nozes, avelã, castanha de caju, amêndoas, pistache, frutas secas, temperos, semente de algodão, mandioca, óleos vegetais, cacau, entre outros que, normalmente, são utilizados na composição de alimentos e rações<sup>12</sup>. Estas toxinas também podem ser encontradas nos tecidos comestíveis de animais, como fígado e músculo<sup>13</sup>.

A incidência de aflatoxinas em alimentos e rações é relativamente alta em regiões tropicais e subtropicais, onde o clima quente e úmido proporciona as condições ideais para o crescimento dos fungos<sup>14</sup>. Por isso, o Brasil apresenta condições ideais para o desenvolvimento desses fungos. O fungo do gênero *Aspergillus* sp. se desenvolve em temperatura que varia de 25 a 30 °C, mas tolera temperaturas na faixa de 12 a 45 °C, e umidade relativa entre 83 e 85%<sup>15</sup>. Além disso, ainda é observado no país a utilização de práticas agrícolas inadequadas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenamento de cereais e grãos, originando produtos trincados e quebrados que favorecem a entrada e a contaminação de fungos toxigênicos<sup>16</sup>.

Algumas práticas no plantio e armazenamento dos alimentos agrícolas podem diminuir, ou até mesmo evitar, a produção de aflatoxinas. Como exemplos destas práticas podem-se citar: a rotação de culturas a fim de repor a matéria orgânica no solo, aumentando o crescimento de microorganismos que têm efeitos inibitórios sobre o *A. flavus*; planejar a época de plantio para que a colheita coincida com a estação seca; evitar danos mecânicos durante a colheita; colher apenas alimentos maduros, pois a infecção fúngica é mais propensa a ocorrer em grãos enrugados e rachados; e controlar a temperatura e umidade durante a estocagem<sup>17</sup>.

O cuidado para prevenir a contaminação de alimentos com as aflatoxinas é imprescindível para a saúde, pois a exposição por inalação ou ingestão desta toxina pode ocasionar sérios problemas à saúde, que variam consideravelmente dependendo das espécies animais, doses, dieta, idade e sexo<sup>18</sup>. As aflatoxinas apresentam ampla atividade biológica, como toxicidade aguda, teratogenicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade<sup>19</sup>.

As aflatoxinas reagem com os componentes celulares, incluindo os ácidos nucleicos, as organelas citoplasmáticas e as proteínas celulares, onde interrompe o processo celular normal<sup>20</sup>. Após a ingestão, por serem moléculas de baixo peso molecular e lipofílicas, estas toxinas são facilmente absorvidas pelo o intestino delgado, principalmente no duodeno. Na mucosa do trato gastrointestinal, as aflatoxinas são biotransformadas e os principais produtos que interagem com as proteínas da mucosa gastrointestinal são o 8,9-epóxido, o dihidrodiol e a aflatoxina B<sub>2a</sub>. As aflatoxinas seguem então para o fígado, onde são concentradas devido à alta permeabilidade da membrana do hepatócito a essas toxinas e ao processo de biotransformação pelas enzimas presentes na fração citosol e microssômica da célula hepática. O produto reativo, 8,9-epóxido, pode se ligar tanto ao DNA como à albumina sérica, formando adutos de aflatoxina-N7-guanina e aflatoxina-N7-lisina, respectivamente. As ligações covalentes dos adutos no DNA são consideradas um passo crítico na

hepatocarcinogênese das aflatoxinas. Posteriormente, os produtos de biotransformação são conjugados com o glutathione, ácido glicurônico e sulfatos. A eliminação das aflatoxinas e seus produtos do organismo ocorre primeiramente pela secreção biliar (~58%), seguida pela urina (~35%). Em lactentes e animais em lactação, uma fração considerável é eliminada pelo leite na forma de aflatoxina M<sub>1</sub><sup>21,22</sup>.

Os efeitos agudos são essencialmente observados na estrutura e funcionalidade do fígado, incluindo necrose das células hepática, hemorragia, lesões, fibrose e cirrose. Adicionalmente, encefalopatia hepática, imunossupressão, infecções respiratórias, hemorragia gastrointestinal, anorexia, mal-estar e febre têm sido observados. A exposição crônica a aflatoxinas leva muitas vezes ao cancro do fígado, assim como carcinomas de outros órgãos (rim, pulmão, cólon e do sistema nervoso). A aflatoxina B<sub>1</sub> é o mais potente hepatocarcinógeno descrito em mamíferos e é classificada no Grupo 1 (provável carcinógeno) pela IARC (“International Agency of Research on Cancer”)<sup>23</sup>.

Por apresentar-se potencialmente perigosa para a saúde pública e por constituir um grave problema econômico para a agricultura, é de suma importância a criação de legislações que limitem seus níveis máximos nos alimentos. No Brasil, durante muitos anos as aflatoxinas foram as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos eram previstos na legislação. Mas, no dia 22 de fevereiro de 2011, foram publicados no Diário Oficial da União os limites máximos tolerados (LMT) para outras micotoxinas em alimentos, como ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>), patulina (PAT) e zearalenona (ZON). A Tabela 1 apresenta os valores atuais dos limites máximos tolerados para aflatoxina em diversos alimentos<sup>24</sup>.

Vários métodos para a detecção da aflatoxina B<sub>1</sub> têm sido investigados, entre eles cromatografia de camada delgada (CCD)<sup>25</sup>, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>26</sup> e ensaio imunoenzimático (ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay”)<sup>27</sup>. No entanto, a maior parte destes processos demanda muito tempo de análise, é muito propensa a ação de interferentes e pode não ser confiável para algumas amostras alimentícias e biológicas. Por isso, os imunossensores eletroquímicos demonstram ser uma alternativa viável na análise devido à detecção rápida, sensibilidade, alta especificidade, muitas vezes apresentam simplicidade no desenvolvimento e custo reduzido<sup>28</sup>.

Um imunossensor é definido como um dispositivo sensorial constituído por um anticorpo (ou antígeno) acoplado a superfície de um transdutor, que converte o sinal biológico em um sinal elétrico mensurável<sup>29</sup>.

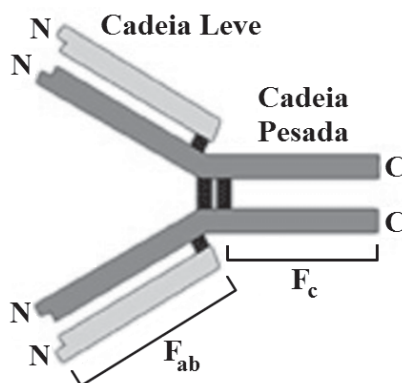
**Tabela 1.** Limites máximos tolerados de aflatoxina em alimentos segundo portaria da ANVISA publicada em 22/02/2011.

| Micotoxina                                                                    | Alimentos                                                                                                                             | LMT<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Aflatoxina M <sub>1</sub>                                                     | Leite fluido                                                                                                                          | 0,5                              |
|                                                                               | Leite em pó                                                                                                                           | 5                                |
|                                                                               | Queijos                                                                                                                               | 2,5                              |
| Aflatoxinas<br>B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> | Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados                                                                               | 5                                |
|                                                                               | Feijão                                                                                                                                | 5                                |
|                                                                               | Castanhas, exceto Castanha-do-Brasil                                                                                                  | 10                               |
|                                                                               | Frutas desidratadas e secas                                                                                                           | 10                               |
|                                                                               | Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto                                                                                      | 20                               |
|                                                                               | Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto                                                                                      | 10                               |
|                                                                               | Castanha-do-Brasil com casca para processamento posterior                                                                             | 15                               |
|                                                                               | Alimentos à base de cereais para alimentação infantil                                                                                 | 1                                |
|                                                                               | Fórmulas infantis para lactantes e fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância                     | 1                                |
|                                                                               | Amêndoas de cacau                                                                                                                     | 10                               |
|                                                                               | Produtos de cacau e chocolate                                                                                                         | 5                                |
|                                                                               | Especiarias como pimentas, pimenta em pó pimenta caiena, pimentão-doce, pimenta branca, pimenta preta, noz moscada, gengibre, cúrcuma | 20                               |
|                                                                               | Amendoim (com casca, descascado, cru ou torrado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim                                           | 20                               |
|                                                                               | Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho                                                | 10                               |

Nestes últimos anos, o desenvolvimento de imunossensores tem se mostrado vantajoso dentre os métodos de detecção de aflatoxinas. Jin et al.<sup>30</sup> desenvolveram um imunossensor piezelétrico do tipo competitivo indireto para a detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> com nanopartículas de ouro para amplificar a resposta do anticorpo secundário. Um imunossensor impedimétrico baseado na tecnologia dos eletrodos impressos de grafite (“screen-printed electrode” - SPE) também foi estudado para detectar e quantificar aflatoxina M<sub>1</sub> em amostras de leite<sup>31</sup>. A literatura registra outro trabalho empregando eletrodos impressos de grafite para a análise de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite utilizando imunoensaio do tipo competitivo entre a aflatoxina M<sub>1</sub> presente na amostra e a aflatoxina M<sub>1</sub> conjugada com a enzima peroxidase (HRP), com monitoramento amperométrico da reação enzimática via tetrametilbenzidina (TMB)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>32</sup>.

Para obter um imunossensor que apresente sensibilidade e estabilidade, os anticorpos devem estar imobilizados sobre o transdutor e manter sua atividade biológica sobre o transdutor<sup>33</sup>. As interações do anticorpo com o antígeno são geralmente interações de van der Waals que ocorrem nos epitopos (porções F<sub>ab</sub>) do anticorpo, mas a maioria das interações antígeno-anticorpo contém pelo menos uma ligação de hidrogênio<sup>34</sup>. A imobilização do

anticorpo na superfície do transdutor deve ocorrer pela porção  $F_c$  para manter as porções  $F_{ab}$  livre para tais interações. A representação da estrutura de um anticorpo é representada na Figura 3.



**Figura 3.** Representação do anticorpo e suas regiões.

Para isso existem alguns procedimentos empregados que unem ambas as características, como a imobilização de anticorpos sobre a proteína A<sup>35</sup> ou empregando monocamadas auto-organizadas (“self-assembled monolayers” - SAM) sobre a superfície do eletrodo<sup>36</sup>.

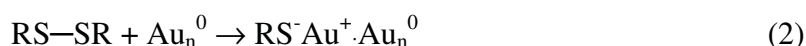
Para a construção de uma superfície com anticorpos imobilizados de forma ordenada e orientada, a proteína A é bastante empregada como ponte para a ligação transdutor-anticorpo. A proteína A é um componente da parede celular das bactérias *Staphylococcus aureus* e tem como característica ligar-se com a porção  $F_c$  do anticorpo, permitindo que a porção  $F_{ab}$  fique livre para interagir com o antígeno. Portanto, a imobilização do anticorpo sobre a proteína A propicia imunoreações altamente eficientes e melhora o desempenho do sistema de detecção<sup>37,38</sup>.

As monocamadas auto-organizadas recentemente têm se tornado muito utilizadas no desenvolvimento de biossensores, nanotecnologia e eletrônicos biomoleculares devido a sua simplicidade, versatilidade, estabilidade e possibilidade de produzir, em escala molecular, estruturas altamente ordenadas<sup>39</sup>. A estrutura da SAM consiste na interação de uma camada de moléculas orgânicas altamente organizadas sobre a superfície do eletrodo e um dos grupos funcionais da molécula orgânica selecionada tem a função de proporcionar a imobilização de materiais biológicos (e.g. enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, anticorpo, etc.) através do grupo funcional livre da SAM<sup>40</sup>.

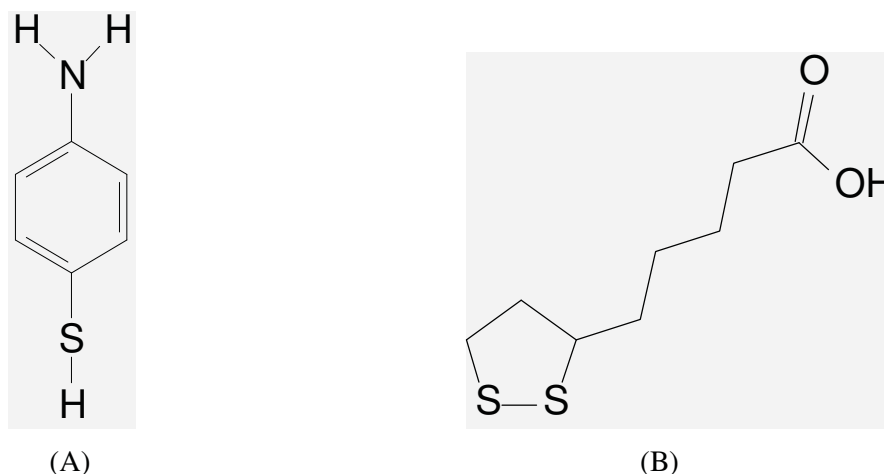
A investigação da imobilização de proteínas empregando SAMs é um passo essencial para a compreensão do efeito químico em sua vizinhança e contribuição dos grupos terminais para o processo de imobilização, devido ao fato de que a imobilização constitui uma

oportunidade de explorar o ambiente químico molecular com precisão. Desta forma, a tecnologia da SAM é de grande importância para o desenvolvimento de biosuperfícies que podem ser utilizadas como ferramenta para descoberta de drogas e diagnóstico de doenças, no mapeamento genético e em dispositivos de reconhecimento e em sensores para aplicação ambiental, industrial ou clínica<sup>41</sup>.

Monocamadas orgânicas ordenadas de compostos à base de enxofre sobre a superfície de eletrodos de ouro são de grande interesse. O grupo terminal de enxofre destas moléculas é ligado a superfícies de ouro via uma ligação S-Au extremamente forte, enquanto que os grupos funcionais na outra extremidade da molécula controlam as propriedades da superfície do eletrodo, tais grupos podem ser manipulados de acordo com as mais variadas aplicações<sup>42</sup>. As reações abaixo mostram o mecanismo para a formação da SAM, empregando moléculas com grupamento tiol (1) e dissulfeto (2), sobre uma superfície de ouro<sup>43</sup>:



Dentre as moléculas que possuem essas propriedades estão o p-aminotiofenol (p-ATP)<sup>44</sup> e o ácido lipóico<sup>45</sup>, cujas estruturas moleculares são apresentadas na Figura 4.



**Figura 4.** Estrutura do p-aminotiofenol (A) e do ácido lipóico (B).

O p-ATP apresenta um grupo tiol e um grupo amino livre ligados a um anel aromático, que propicia a ressonância eletrônica na molécula. O grupo tiol se liga ao ouro enquanto o amino interage com o material biológico. Já o ácido lipóico apresenta um dissulfeto cíclico, que pode ser convertido à forma ditiol para ligar-se ao ouro mantendo, na outra extremidade, um grupo carboxílico livre para a imobilização de moléculas biológicas.

Como a SAM com grupamento tiol apresenta forte afinidade com o ouro, transdutores desses materiais são amplamente empregados no desenvolvimento de biossensores.

Os eletrodos convencionais de ouro podem ser substituídos com vantagens, principalmente na construção de sensores, por substratos metálicos obtidos a partir de discos compactos graváveis (CD-R). O processo de deposição dos filmes de ouro sobre os CD graváveis são muito bem estabelecidos pela indústria fonográfica<sup>46</sup>.

Os CD-Rs de ouro são constituídos por uma base de policarbonato acrescida de uma camada fotossensível (cianina, ftalocianina ou azo compostos), na qual ocorre o processo de gravação. Sobre este filme é depositada, pelo processo de “sputtering”, uma fina camada de ouro com espessura variando entre 50 e 100 nm e área total da ordem de 100 cm<sup>2</sup>, que é recoberta por um ou dois filmes poliméricos protetores<sup>47</sup>.

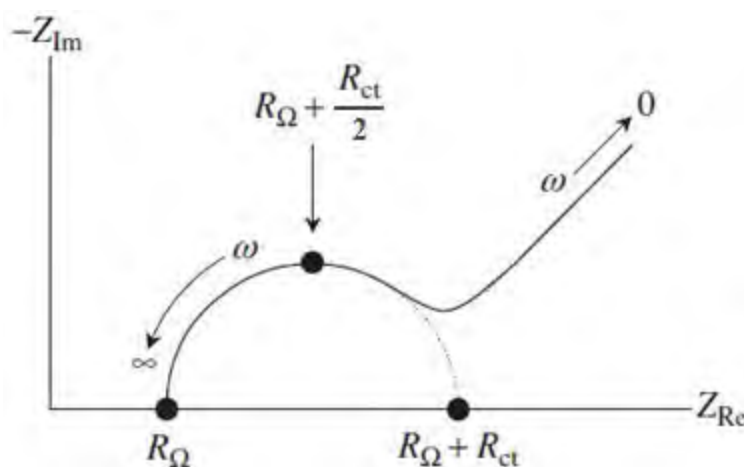
Devido à simplicidade na construção e o baixo custo, estes dispositivos podem ser empregados nas medidas eletroquímicas e, se necessário, descartados em caso de formação de óxidos na superfície e adsorção irreversível<sup>48</sup>. Esses eletrodos são conhecidos como CDtrodos e tem mostrado desempenho eletroquímico comparável aos eletrodos de ouro comerciais, a um custo muito mais reduzido, já que com um CD é possível obter vários eletrodos<sup>49</sup>.

A interação molecular que ocorre entre a biomolécula, a monocamada e a superfície do transdutor pode ser estudada usando uma ampla variedade de técnicas eletroquímicas (por exemplo, voltametria cíclica, EIS - espectroscopia de impedância eletroquímica) e de análise de superfície como microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FE-SEM) e microscopia de força atômica (AFM).

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos<sup>50</sup>.

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional. Na EIS surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da

aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado)<sup>51</sup>. Uma das principais maneiras de interpretar os resultados de impedância é a partir do diagrama de Nyquist, que relaciona a parcela imaginária da impedância com a parcela real para um determinado intervalo de frequência. Alguns parâmetros como a resistência ôhmica da solução ( $R_{\Omega}$ ) e a resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) podem ser obtidos através deste diagrama<sup>52</sup>, como observado na Figura 5.



**Figura 5.** Representação de um diagrama de Nyquist com as principais características de um diagrama de impedância.

Na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retroespalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retroespalhados fornecem imagem característica de variação de composição. Quando essa técnica se baseia em fontes de emissão de campo de feixe de elétrons, é chamada de FE-SEM<sup>53</sup>.

Para a obtenção de imagens topográficas, a partir da microscopia de força atômica, é empregada uma sonda constituída de uma fina ponteira (“tip”) acoplada a um “cantilever”, para fazer o rastreamento da superfície da amostra. A deflexão do “cantilever” é a resposta das forças de interações atômicas entre a ponteira e o substrato. A técnica de AFM pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente (“tapping”). Sendo que no modo contato intermitente a ponta vibrante fica próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo

modo contato. A comparação entre os modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente<sup>54</sup>.

Em nosso grupo de pesquisa, algumas metodologias já foram desenvolvidas para a construção de sensores eletroquímicos empregando diferentes transdutores, moléculas e matrizes biológicas<sup>55,56,57</sup>. O presente trabalho constitui no desenvolvimento de dois imunossensores para determinação de aflatoxina B<sub>1</sub> em amostras alimentícias, um impedimétrico e outro amperométrico. Para isso várias modificações da superfície do CDtrodo de ouro (Au-CDtrodo) foram analisadas para a imobilização do anticorpo anti-aflatoxina B<sub>1</sub> e imunoensaio com o antígeno aflatoxina B<sub>1</sub>.

## 2 OBJETIVOS

Desenvolvimento de imunossensores, impedimétrico e amperométrico, para a detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> em amostras de alimentos.

Para atingir o objetivo geral deste trabalho, foram realizadas as seguintes etapas:

- Construção de Au-CDtrodos e caracterização das superfícies;
- Avaliação do melhor método para a imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>;
- Otimização das condições experimentais para a imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> via planejamento fatorial e realização de imagens de AFM e FE-SEM desta etapa de modificação;
- Estudo das melhores condições da solução de soroalbumina bovina (solução bloqueio) e do antígeno AFB<sub>1</sub> via planejamento fatorial e finalização do imunossensor impedimétrico;
- Otimização das condições experimentais para a imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> conjugado com a enzima peroxidase e monitoramento da reação imunoenzimática no sistema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/5-ASA;
- Aplicação dos imunossensores em amostras de amendoim.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes e soluções

A retirada das camadas protetoras do filme de ouro dos tipos de CD-R (marca Mitsui Archive Gold CD-R 100, tipos: Archive, Inkjet e MAM-A) foi realizada empregando ácido nítrico 69-70% (J. T. Baker) e a limpeza eletroquímica dos eletrodos de ouro foi realizada empregando ácido sulfúrico 95-98% (J. T. Baker).

Para a formação das diferentes SAMs sobre a superfície de ouro do CDtrodo foram empregados o p-aminotiofenol ( $C_6H_7NS$  - Sigma-Aldrich) diluído em etanol anidro (J. T. Baker) e o ácido lipóico ( $C_8H_{14}O_2S_2$  - Sigma-Aldrich) diluído em etanol:água (1:10).

A ativação do grupo carboxílico do ácido lipóico foi realizada através da 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC - Fluka) e N-hidroxi-succinamida (NHS - Sigma).

As soluções de proteína A (Sigma-Aldrich), empregada na modificação do eletrodo para a imobilização do anticorpo, e a solução de anticorpo (Ac) anti-aflatoxina  $B_1$  produzido em coelhos (Sigma-Aldrich, lote 017K4837) foram diluídas em solução tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4.

Após a imobilização do anticorpo, procedeu-se o bloqueio da superfície com solução de soroalbumina bovina (BSA - Sigma) diluída em solução tampão fosfato contendo  $0,14 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl,  $0,003 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl e 0,02% de Tween 20 a pH 7,5 (solução tampão PBS-T).

Seguiu-se com a interação do anticorpo com o antígeno aflatoxina  $B_1$  obtida de *Aspergillus flavus* (Sigma-Aldrich) e imobilização do anticorpo anti-AFB $_1$  conjugado com a enzima peroxidase (Ac\*) produzido em coelhos (Sigma-Aldrich, lote 123K4820). Essas soluções foram solubilizadas na solução de bloqueio.

Para as medidas eletroquímicas, a solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 foi empregada como eletrólito de suporte, juntamente com o par redox  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

O monitoramento amperométrico foi realizado em solução-tampão citrato-fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5,0, juntamente com o substrato peróxido de hidrogênio 30% (Sigma) e o mediador ácido 5-aminossalicílico (5-ASA - Acros).

Na preparação das soluções-tampão foram empregados fosfato de sódio monobásico e dibásico e ácido cítrico monohidratado fornecidos pela Sigma. Todas as soluções-tampão foram preparadas conforme “Methods in Enzimology”<sup>58</sup>.

As soluções citadas foram preparadas empregando-se água purificada de qualidade Milli-Q ( $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ).

### 3.2 Equipamentos e célula eletroquímica

As imagens topográficas das superfícies dos diferentes CDs de ouro sem modificação foram obtidas empregando um Microscópio de AFM Ntgra Vita. A técnica foi operada em modo não-contato, utilizando pontas (“cantilvers”) de silicone, com constante de força de  $5,6 (\pm 20\%) \text{ N m}^{-1}$  e frequência de ressonância de  $180 (\pm 10\%) \text{ kHz}$ .

As imagens topográficas para as superfícies de ouro com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM de ácido lipóico foram obtidas usando um AFM Agilent Technologies 5500 Scanning Probe Microscope (Agilent Technologies, Inc., California Street, EUA), operadas em modo intermitente (“tapping”). Utilizando pontas de fósforo dopado com silício com constante de força de  $20\text{-}80 \text{ N m}^{-1}$  e frequência de ressonância de  $239\text{-}341 \text{ kHz}$ .

Análises da superfície do CDtrodo de ouro foram realizadas através de microscopia eletrônica de varredura FE-SEM de alta resolução, equipado com fonte de elétrons de emissão de campo, JEOL JSM 7500F.

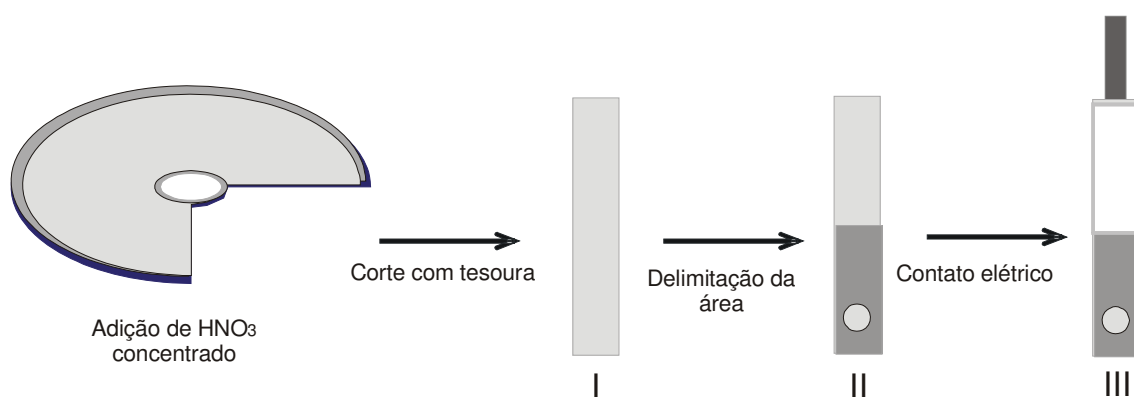
As medidas de voltametria cíclica, voltametria de varredura linear e de amperometria a potencial controlado foram efetuadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 302 e um software GPES 3.0 (“General Purpuse Electrochemical System”) para o tratamento dos dados. Para as medidas de impedância foi empregado o mesmo potenciostato/galvanostato conectado a um analisador de resposta de frequência (FRA). Uma célula eletroquímica de compartimento único com volume de  $5 \text{ mL}$  foi utilizada para as medidas, juntamente com um sistema de três eletrodos: CDtrodo de ouro ( $A_{\text{geom}} = 0,071 \text{ cm}^2$  e área ativa de  $0,091 \text{ cm}^2$  pela equação de Randles-Sevik<sup>52</sup>),  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$  e fio de platina ( $A_{\text{geom}} = 4 \text{ cm}^2$ ) como eletrodo de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente.

Empregou-se um pHmetro da marca Digital Gehaka modelo PG 2000, para a obtenção das medidas de pH.

### 3.3 Construção de eletrodos de ouro (CDtrodos)

Foram utilizados discos compactos graváveis da marca Mitsui Archive Gold CD-R 100 do tipo Archive contendo filme de ouro. Para a obtenção de eletrodos metálicos a partir de CD-R de ouro fez-se necessário o acesso à camada metálica dos mesmos, através da retirada das camadas protetoras do filme de ouro do CD-R com  $\text{HNO}_3$  concentrado. O ácido

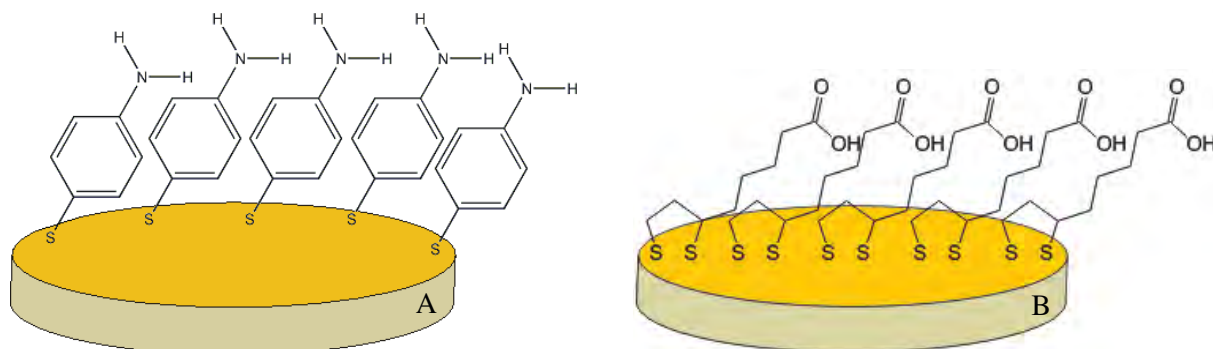
nítrico foi adicionado sobre a superfície do CD-R primeiramente nas bordas e depois com total cobertura da superfície com auxílio de uma pipeta. Após alguns minutos (5-10 minutos) de contato com o ácido nítrico ocorreu o total desprendimento das camadas de proteção composta de duas membranas e a superfície foi lavada abundantemente com água destilada. A lavagem foi realizada com auxílio de uma pisseta exercendo forte pressão. A superfície do CD-R sem as películas protetoras foi cortada com auxílio de uma tesoura tendo o cuidado para não desprender o filme de ouro sobre a base de policarbonato do CD-R. A área do eletrodo de trabalho foi pré-definida com a fita adesiva de galvanoplastia (1KFA25 Kapton tape<sup>®</sup>) perfurada com um alicate furador e fixada sobre o filme de ouro. Para o contato elétrico foi utilizada uma lâmina de cobre (fio de cobre laminado e polido com lixa 3M 800) fixado com uma fita de PTFE (politetrafluoretileno)<sup>47</sup>. Cabe ressaltar que os eletrodos são descartáveis e foram utilizados em todas as medidas eletroquímicas somente uma vez. Um esquema das etapas de construção do CDtrodo é apresentado na Figura 6.



**Figura 6.** Confeção de CDtrodos: I) área recortada do CD; II) delimitação da área do eletrodo empregando fita de galvanoplastia; III) contato elétrico revestido com fita de teflon.

### 3.4 Modificação da superfície de ouro do CDtrodo

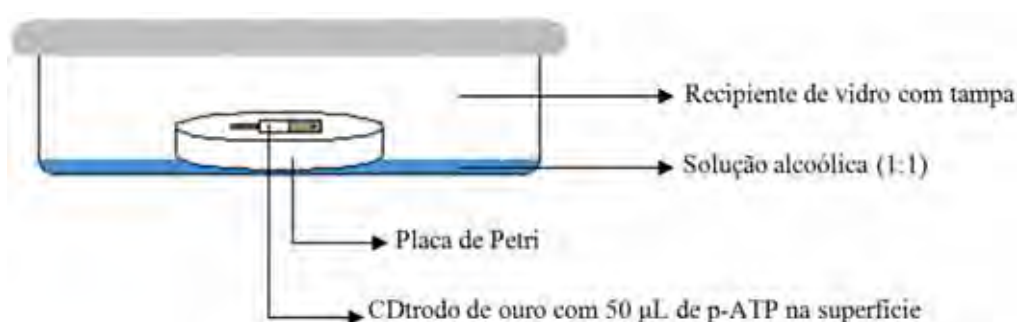
Foram estudados três diferentes compostos para a modificação da superfície de ouro do CD-R: p-ATP, ácido lipóico e proteína A. Os dois primeiros compostos, por apresentarem enxofre em sua estrutura, ligam-se ao Au covalentemente formando a SAM<sup>42</sup>, conforme representadas na Figura 7. A proteína A, formada por aminoácidos que apresentam grupamentos SH em sua estrutura, também interage com a superfície de ouro via ligação covalente.



**Figura 7.** Representação da superfície de ouro do CDtrodo modificada com p-ATP (A) e com ácido lipóico (B).

### 3.4.1 Modificação com p-ATP

Para a modificação da superfície com p-ATP, uma câmara úmida foi desenvolvida com o objetivo de retardar a evaporação do etanol utilizado na diluição do p-ATP, empregando-se um recipiente de vidro bem vedado e adicionando-se 150 mL de solução alcoólica 1:1 (etanol/água). Uma placa de Petri foi colocada dentro do recipiente contendo a solução alcoólica e, sobre a placa, os CDtrodos de ouro com 50  $\mu\text{L}$  de p-ATP adicionados na forma de gota, conforme esquematizada na Figura 8. Foram estudadas diferentes concentrações:  $1 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  e tempos de incubação: 15, 30, 60 e 120 minutos. Durante todo o período de incubação, a câmara úmida permaneceu a uma temperatura de aproximadamente  $7^\circ\text{C}$  (geladeira). Após o período de incubação, a lavagem do eletrodo foi por imersão em etanol absoluto, sob leve agitação, num total de 3 vezes de 10 segundos.



**Figura 8.** Esquema da câmara úmida

### 3.4.2 Modificação com proteína A

A imobilização da proteína A foi realizada pela adição de 10  $\mu\text{L}$  da solução protéica  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  com incubação de 3 horas a temperatura ambiente diretamente sobre a superfície de trabalho do CDtrodo e sobre a superfície de ouro modificada com SAM de ácido lipóico ativado com EDC/NHS.

### 3.4.3 Modificação com ácido lipóico

Quando o ácido lipóico foi empregado para a formação da SAM sobre a área de trabalho do CDtrodo, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução alcoólica 1:10 (etanol/água) de ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com 2 horas de incubação a temperatura ambiente<sup>59</sup>. Após o período de incubação, a lavagem do eletrodo foi por imersão em água destilada, sob leve agitação, num total de 3 vezes de 10 segundos.

## 3.5 Imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>

A imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> foi efetuada sobre os três diferentes modificadores da superfície de ouro do CDtrodo descrito no item 3.4: p-ATP, proteína A e ácido lipóico.

### 3.5.1 SAM p-ATP - anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>

Quando o p-ATP foi empregado para a formação da SAM sobre a superfície de ouro do eletrodo, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da solução de anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> com diluição 1:2000 ( $0,067 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) e avaliados diferentes tempos de incubação: 1, 3, 6, 10, 12 e 18 horas através da voltametria cíclica e EIS.

### 3.5.2 Proteína A - anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>

O anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> foi imobilizado somente sobre a proteína A imobilizada diretamente na superfície de ouro. A imobilização foi realizada através da adição de 10  $\mu\text{L}$  da solução de anticorpo com diluição de 1:2000 com tempo de incubação de 12 horas e avaliada através da EIS.

### 3.5.3 SAM ácido lipóico - anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>

Antes da imobilização do anticorpo sobre a SAM de ácido lipóico fez-se necessária a ativação de seu grupo carboxílico através da adição de 10  $\mu\text{L}$  da mistura EDC/NHS  $0,4 \times 10^{-3}/0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com incubação de 1h a temperatura ambiente na superfície do eletrodo modificado<sup>60</sup>.

A imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> foi realizada pela adição de 10  $\mu\text{L}$  da solução com diferentes concentrações e tempos de incubação, que foram avaliados através de planejamento fatorial completo do tipo  $2^2$  empregando a técnica de EIS. A Tabela 2 apresenta os níveis alto e baixo aplicados para as variáveis.

**Tabela 2.** Matriz de planejamento fatorial completo de duas variáveis e dois níveis

| Variável                          | Nível Alto     | Nível Baixo     |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| $C_{Ac-AFB_1} / \mu g \mu L^{-1}$ | 0,0067 (1:500) | 0,0017 (1:2000) |
| $T_{incub.} / h$                  | 12             | 1               |

### 3.6 Otimização da solução bloqueio e das condições para a reação imunoenzimática Ac-Ag

Depois de otimizar a imobilização do anticorpo anti- $AFB_1$ , foram analisadas, através de estudo quimiométrico por meio do planejamento fatorial completo do tipo  $2^3$ , as melhores condições das variáveis: concentrações de BSA e do antígeno (Ag)  $AFB_1$  e o tempo de incubação da  $AFB_1$  sobre os CDtrodo. A Tabela 3 apresenta os níveis altos e baixos avaliados.

**Tabela 3.** Matriz de planejamento fatorial completo de três variáveis e dois níveis

| Variável                 | Nível Alto           | Nível Baixo          |
|--------------------------|----------------------|----------------------|
| $C_{BSA} / \%$           | 1,0                  | 0,5                  |
| $C_{AFB_1} / mol L^{-1}$ | $1,0 \times 10^{-7}$ | $1,0 \times 10^{-8}$ |
| $T_{incub. AFB_1} / min$ | 30                   | 15                   |

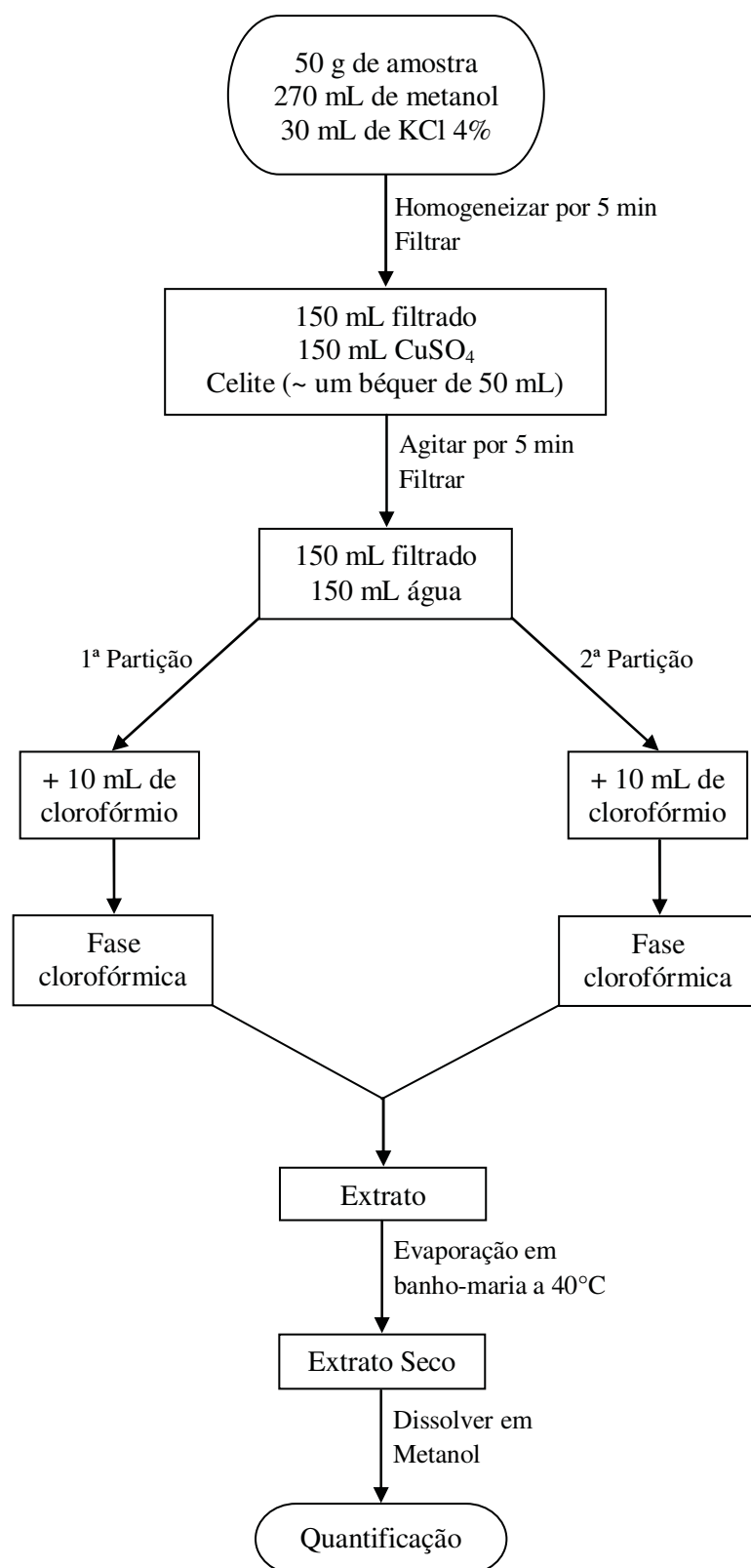
Posteriormente, foi realizado o estudo do tempo de incubação de BSA empregando os tempos de 30, 40 e 60 minutos.

### 3.7 Imobilização do anticorpo anti- $AFB_1$ conjugado com a enzima HRP

Para o desenvolvimento do imunossensor amperométrico é necessário a adição de um anticorpo conjugado com a enzima peroxidase (HRP) para o monitoramento da reação enzimática via redução do mediador. Por essa razão, após a adição da solução de  $AFB_1$  foi acrescentado 10  $\mu L$  da solução do anticorpo anti- $AFB_1$  marcado com HRP nas diluições de 1:500, 1:2000 e 1:4000 com 1 hora de incubação.

### 3.8 Processo de extração da $AFB_1$ em amostras de amendoim

As aflatoxinas presentes nas amostras de amendoim cru foram extraídas em metanol. O procedimento de extração da toxina<sup>61</sup> foi realizado como descrito no fluxograma do Esquema 1.



**Esquema 1.** Fluxograma da extra     da aflatoxina B<sub>1</sub> em amostras de alimentos.

### 3.9 Condições empregadas para os estudos voltamétricos

Para a limpeza da superfície, os CDtrodos foram submetidos a um pré-tratamento voltamétrico de 10 ciclos em ácido sulfúrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , no intervalo de potencial entre +0,2 e +1,5 V e velocidade de varredura igual a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Para os diferentes estudos de voltametria cíclica, foi utilizado o intervalo de potencial de -0,4 a +0,7 V em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 na presença e ausência do par redox  $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A voltametria de varredura linear foi empregada para a escolha do potencial de redução a ser aplicado nos estudos amperométricos, em um intervalo de potencial entre -0,75 e +0,9V em solução tampão citrato-fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5,0 na presença e ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (substrato enzimático) e 5-ASA  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (mediador de elétrons), com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 3.10 Condições empregadas para os estudos de EIS

A análise de impedância foi realizada em duas diferentes taxas de frequências: de 100 kHz a 10 mHz e de 100 kHz a 100 mHz. Foi empregado o potencial de circuito aberto ( $E_{OC}$ ) com 15 minutos de estabilização, amplitude de 10 mV (rms) e 50 pontos/década. As medidas foram realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 contendo o par redox  $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas a temperatura ambiente e empregando uma gaiola de Faraday. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

### 3.11 Monitoramento amperométrico

O monitoramento da reação imunoenzimática por técnica amperométrica nas soluções de peróxido de hidrogênio (substrato) e ácido 5-aminossalicílico (mediador) na proporção de 1:7, respectivamente, preparadas em solução tampão citrato-fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5,0 e incubação de 2 minutos<sup>59</sup>.

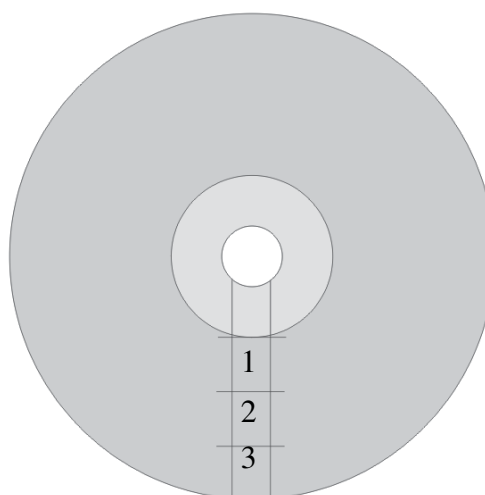
### 3.12 Imagens de microscopia de força atômica da superfície de ouro do CD-R

#### 3.12.1 Estudo das superfícies sem modificação

Para a caracterização da superfície de ouro sem modificação via AFM, foram empregados três diferentes tipos de CD da marca Mitsui Gold CD-R 100 que apresentam propriedades diferentes quando submetidos a estudos eletroquímicos. Esta etapa do trabalho

foi realizada no laboratório do “Biosensors Group” chefiado pelo Prof. Petr Skládal no Departamento de Bioquímica da “Masaryk University” em Brno, Republica Tcheca.

Para a análise das superfícies foi necessário o acesso a camada metálica dos CDs, realizado através da remoção das camadas protetoras com  $\text{HNO}_3$  concentrado, da mesma maneira realizada na construção do CDtrodo de ouro (item 3.3). Após esta etapa, o CD foi cortado em pequenos pedaços (aproximadamente 2 x 3 cm) em três diferentes regiões do CD: borda interna, meio do CD e borda externa, como mostrado na Figura 9.



**Figura 9.** Esquema das áreas cortadas do CD de ouro: Borda Interna (1), Meio do CD (2) e Borda Externa (3).

A Tabela 4 mostra as propriedades eletroquímicas de cada um dos CDs analisados nas medidas de AFM.

**Tabela 4.** Propriedades eletroquímicas dos CD-Rs.

| CD      | Característica eletroquímica                                |
|---------|-------------------------------------------------------------|
| Inkjet  | Apresenta os melhores resultados eletroquímicos             |
| Archive | Bons resultados nas medidas impedimétricas e amperométricas |
| MAM-A   | Bons resultados apenas nas medidas amperométricas           |

### 3.12.2 Estudo das superfícies com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre SAM

Para obter as imagens do anticorpo imobilizado sobre a superfície do CD modificado, CDtrodos foram construídos e submetidos ao pré-tratamento em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ <sup>47</sup>. Em seguida, formou-se a SAM de ácido lipóico e ativou-a com EDC/NHS. Então, adicionou-se o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> sobre a SAM ativada por 1 hora. Após a lavagem do eletrodo, a fita de galvanoplastia foi removida do CDtrodo, mantendo somente a área de trabalho de 3 mm de diâmetro.

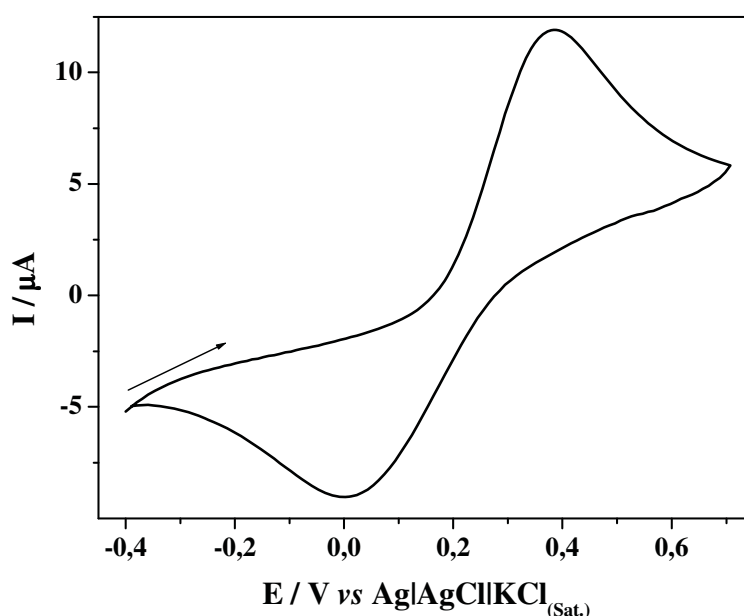
### **3.13 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (FE-SEM) da superfície de ouro do CD-R**

A superfície de ouro com o anticorpo imobilizado sobre a SAM de ácido lipóico ativado empregada para a obtenção das imagens FE-SEM foi preparada da mesma maneira como descrito no item 3.12.2. As medidas foram realizadas com diferença de potencial de 2 kV para a superfície modificada e de 5 kV para a superfície sem modificação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

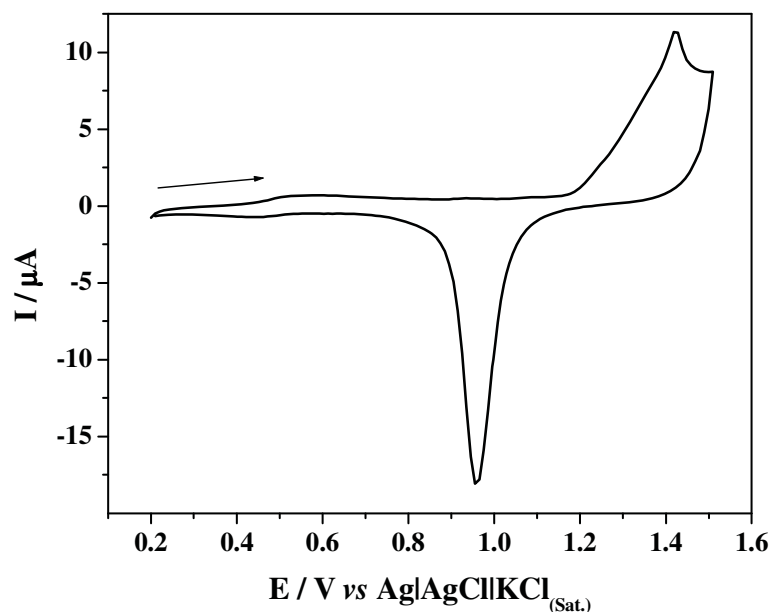
### 4.1. Limpeza da superfície dos CDtrodos de ouro

O CDtrodo foi submetido a ciclagem em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e observou-se que o perfil voltamétrico não apresentou boa definição, pois os picos de oxidação ( $E = 380 \text{ mV}$ ) e redução ( $E = 10 \text{ mV}$ ) mostraram-se bem deformados e bastante afastados um do outro ( $\Delta E_{\text{pico}} = 370 \text{ mV}$ ), conforme mostrado na Figura 10. Esse comportamento pode ser explicado pela ação do ácido nítrico, que provavelmente leva a formação de óxidos de ouro na superfície do transdutor, dificultando a transferência eletrônica envolvendo as espécies redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .



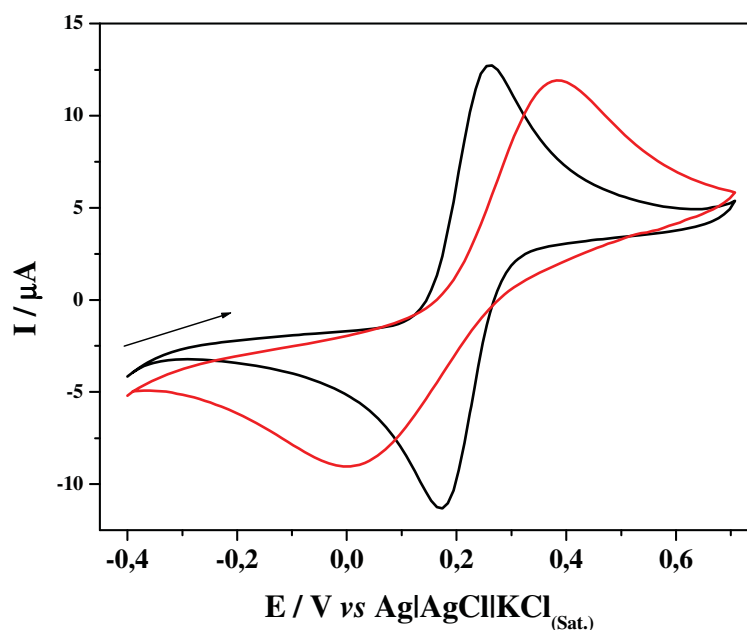
**Figura 10.** Voltamograma cíclico do Au-CDtrodo antes de qualquer pré-tratamento, em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 na presença de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Para melhorar a reversibilidade na transferência de elétrons, o Au-CDtrodo foi submetido a 10 ciclos sucessivos em ácido sulfúrico  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  no intervalo de  $+0,2$  a  $+1,5 \text{ V}$  com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , como apresentado na Figura 11. A adsorção de oxigênio sobre eletrodo de ouro ocorre entre  $+1,2 \text{ V}$  e  $+1,6 \text{ V}$  e a dessorção entre  $+0,8 \text{ V}$  e  $+1,0 \text{ V}$ <sup>62</sup>. Este perfil voltamétrico é um indicativo de que a superfície do eletrodo encontra-se limpa.



**Figura 11.** Voltamograma cíclico em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  do Au-CDtrodo vs  $\text{Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

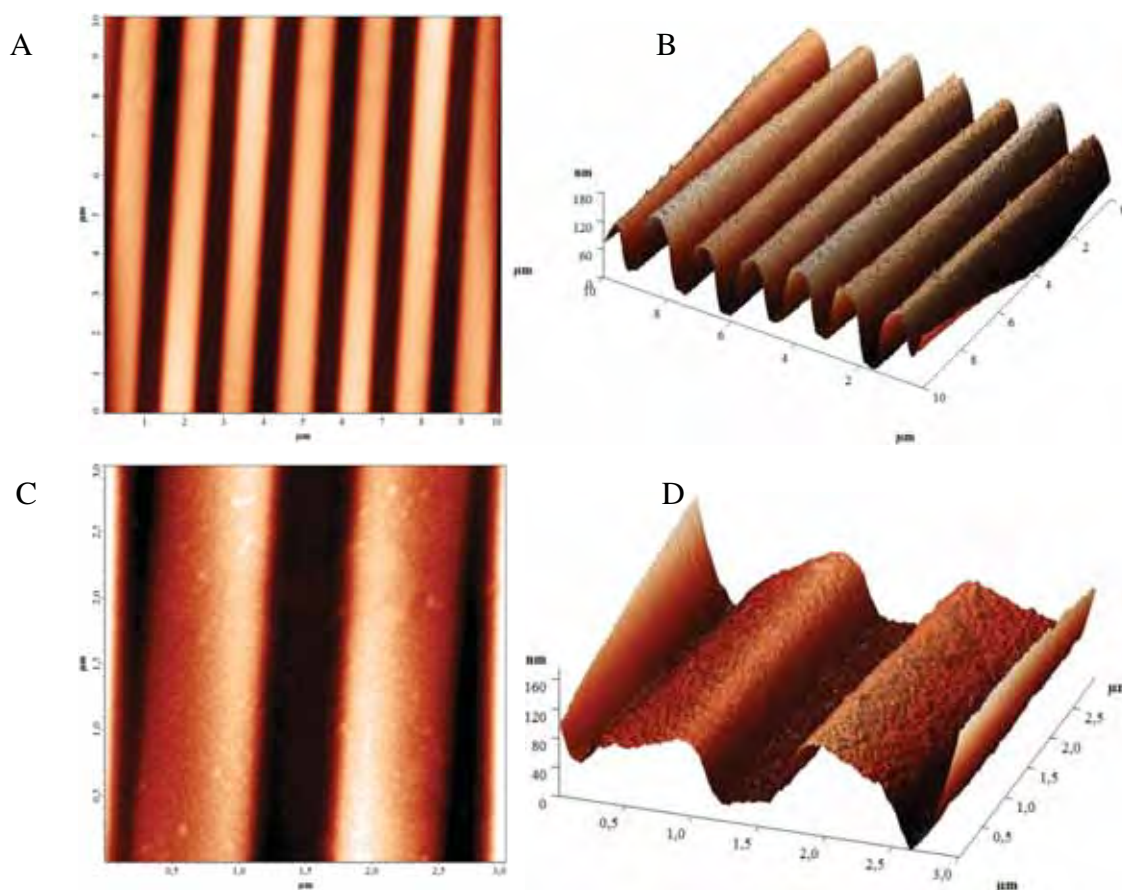
Após o pré-tratamento com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , o eletrodo foi novamente submetido à ciclagem em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 12) e observou-se que houve uma melhora significativa no perfil voltamétrico. Obtendo-se um  $\Delta E_{\text{pico}}$  de aproximadamente 91 mV, que mesmo não sendo o valor ideal (59,2 mV) para uma reação reversível envolvendo um elétron, é considerado um valor aceitável para os estudos posteriores.



**Figura 12.** Voltamograma cíclico em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 na presença de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  antes (—) e após (—) o pré-tratamento do Au-CDtrodo com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vs  $\text{Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

## 4.2 Caracterização através de AFM da superfície de ouro sem modificação de 3 diferentes tipos de CD-R

O CD Inkjet apresenta boa uniformidade nas três diferentes regiões do CD, por isso a Figura 13 apresenta apenas as imagens topográficas da borda externa do CD. Os parâmetros obtidos a partir das imagens são mostrados na Tabela 5.



**Figura 13.** Imagens de AFM da superfície de ouro da borda externa do CD Inkjet: (A) 10×10, (B) imagem em 3D 10×10, (C) 3×3, (D) imagem em 3D 3×3 μm<sup>2</sup>.

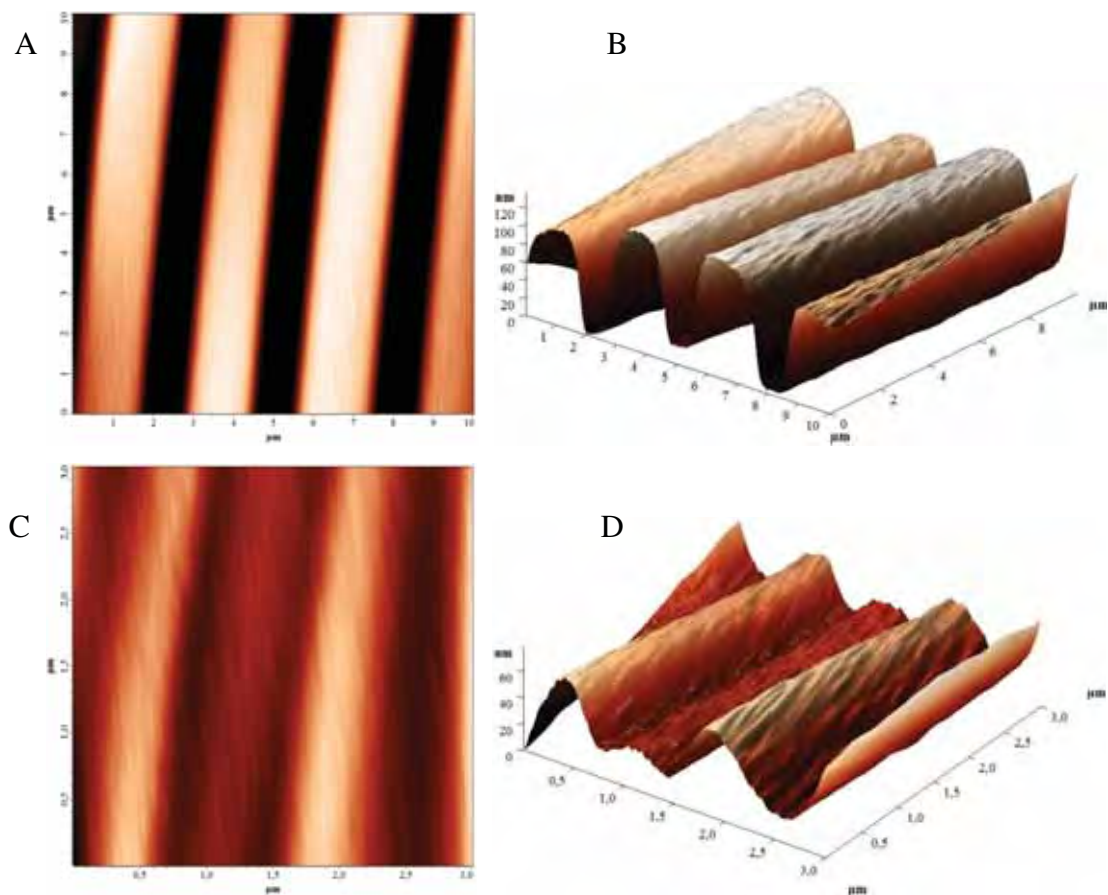
**Tabela 5.** Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para cada região do CD Inkjet.

| CD Inkjet       | Borda interna | Meio        | Borda externa |
|-----------------|---------------|-------------|---------------|
| Altura / nm     | 124 ± 3       | 128 ± 3     | 124 ± 5       |
| Trilha / nm     | 0,51 ± 0,04   | 0,51 ± 0,03 | 0,44 ± 0,04   |
| Cavidade / nm   | 0,21 ± 0,06   | 0,27 ± 0,02 | 0,27 ± 0,02   |
| Rugosidade / nm | 46,1          | 49,2        | 46,3          |

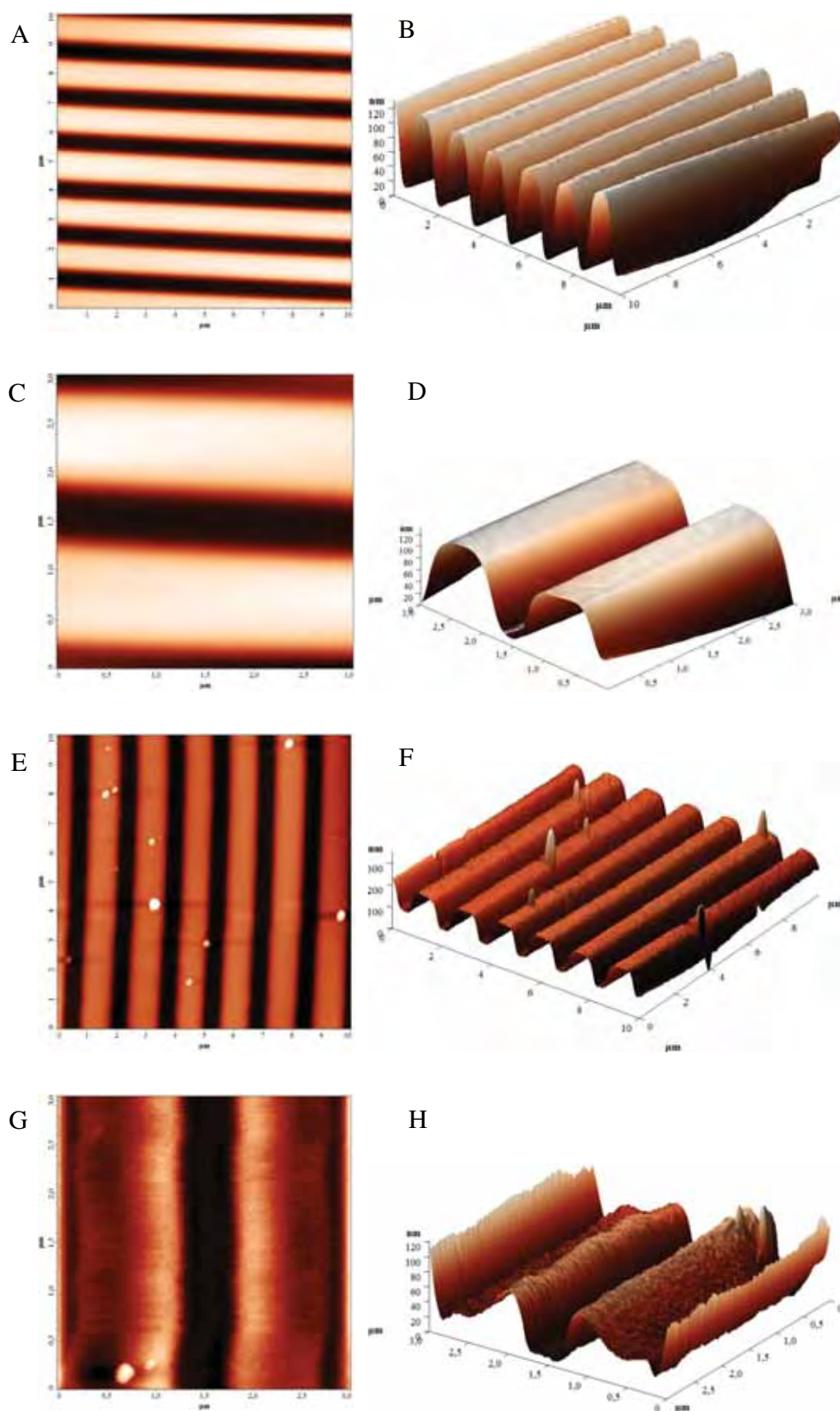
Como observado na Tabela 5, não existe diferença significativa entre a altura e espessura das trilhas de gravação, assim como na espessura das cavidades entre as trilhas. O valor da rugosidade também é semelhante em todas as regiões. Provavelmente devido a essa

boa uniformidade da superfície de ouro, este é o CD que apresenta melhor resultados eletroquímicos.

A Figura 14 mostra as imagens de AFM para a borda interna CD Archive, enquanto a Figura 15 apresenta as imagens do meio e borda externa. Os parâmetros da Tabela 6 foram obtidos a partir dessas figuras.



**Figura 14.** Imagens de AFM da superfície de ouro da borda interna do CD Archive: (A) 10×10, (B) imagem em 3D 10×10, (C) 3×3, (D) imagem em 3D 3×3  $\mu\text{m}^2$ .



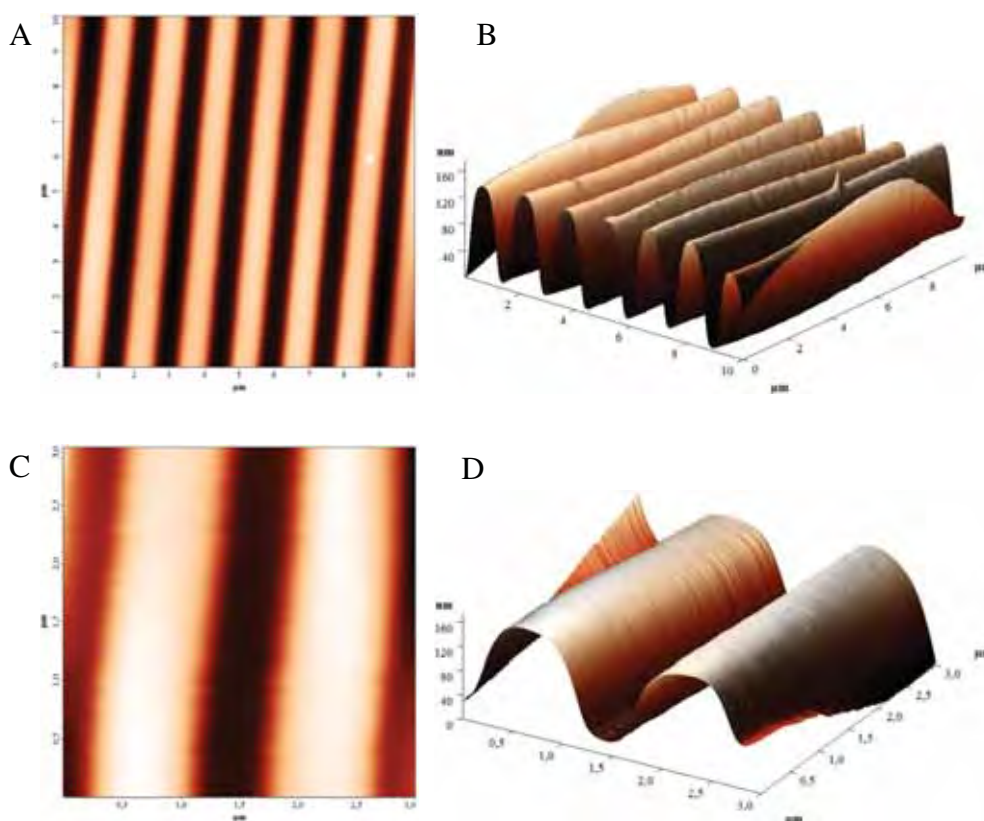
**Figura 15.** Imagens de AFM da superfície de ouro do meio (A-D) e da borda externa (E-H) do CD. Arquivo: (A, E) 10×10, (B,F) imagem em 3D 10×10, (C,G) 3×3, (D, H) imagem em 3D 3×3  $\mu\text{m}^2$ .

A Tabela 6 mostra que o CD Archive tem altura das trilhas e rugosidade semelhante nas 3 regiões do CD, mas apresenta uma grande diferença entre a espessura das trilhas. A borda interna das trilhas é mais espessa e apresentam-se mais distantes entre elas quando comparada as outras regiões do CD. A borda externa e o meio do CD têm valores semelhantes na espessura das trilhas, no entanto a espessura das cavidades da borda interna é aproximadamente duas vezes maior que a espessura do meio do CD. Provavelmente a proporção de 1:2 na repetibilidade das medidas de impedância que este CD apresenta é devido à falta de uniformidade da camada metálica do CD.

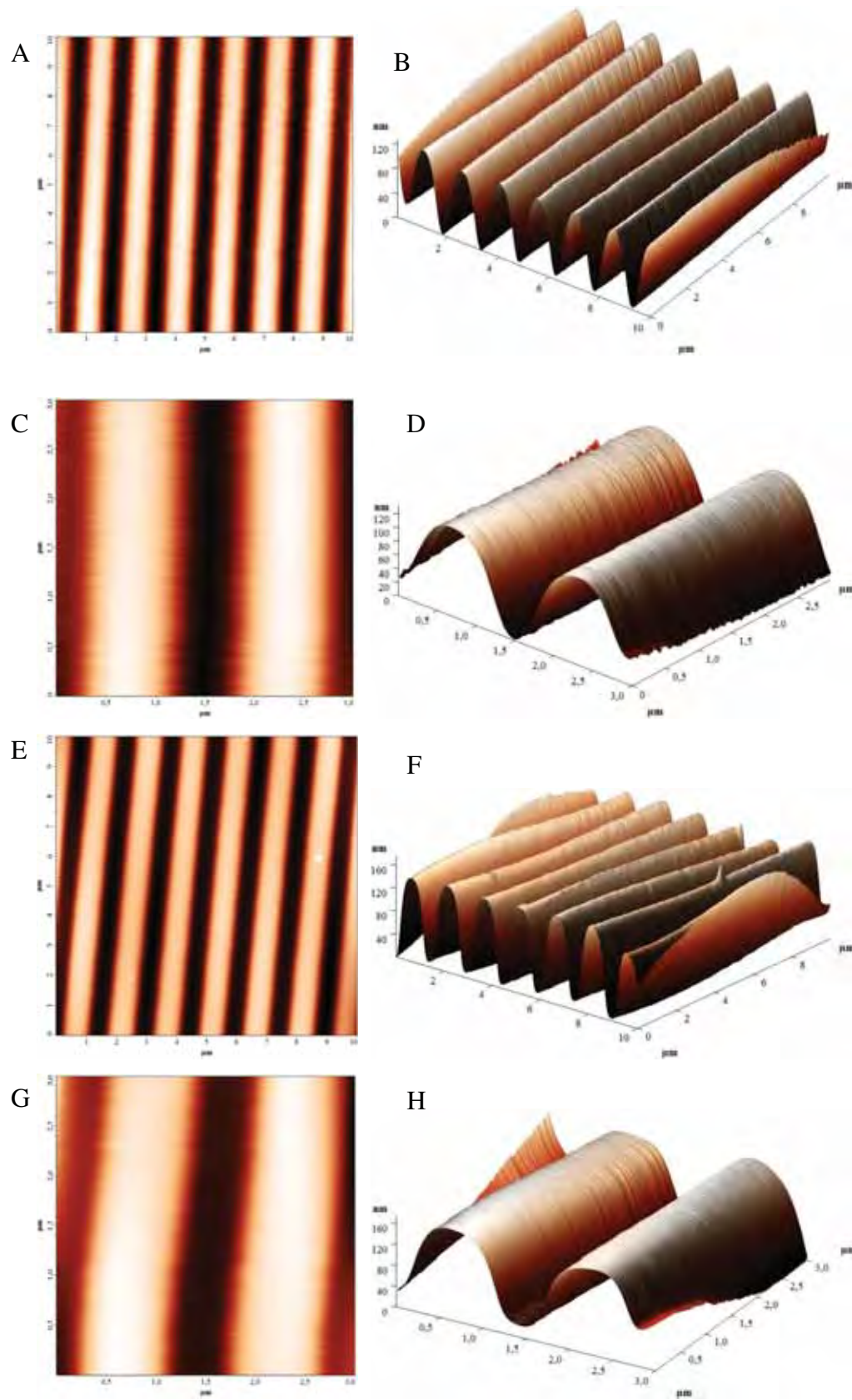
**Tabela 6.** Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para cada região do CD Archive.

| CD Archive      | Borda interna   | Meio            | Borda externa   |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Altura / nm     | $117 \pm 5$     | $114 \pm 2$     | $123 \pm 8$     |
| Trilha / nm     | $1,0 \pm 0,1$   | $0,51 \pm 0,04$ | $0,63 \pm 0,05$ |
| Cavidade / nm   | $0,50 \pm 0,02$ | $0,16 \pm 0,01$ | $0,31 \pm 0,02$ |
| Rugosidade / nm | 42,7            | 40,0            | 45,5            |

A Figura 16 mostra as imagens de AFM para a borda interna CD MAM-A, enquanto a Figura 17 apresenta as imagens do meio e borda externa. Os parâmetros da Tabela 7 foram obtidos a partir dessas figuras.



**Figura 16.** Imagens de AFM da superfície de ouro da borda interna do CD MAM-A: (A) 10×10, (B) imagem em 3D 10×10, (C) 3×3, (D) imagem em 3D 3×3 μm<sup>2</sup>.



**Figura 17.** Imagens de AFM da superfície de ouro do meio (A-D) e da borda externa (E-H) do CD MAM-A: (A, E) 10×10, (B,F) imagem em 3D 10×10, (C,G) 3×3, (D, H) imagem em 3D 3×3  $\mu\text{m}^2$ .

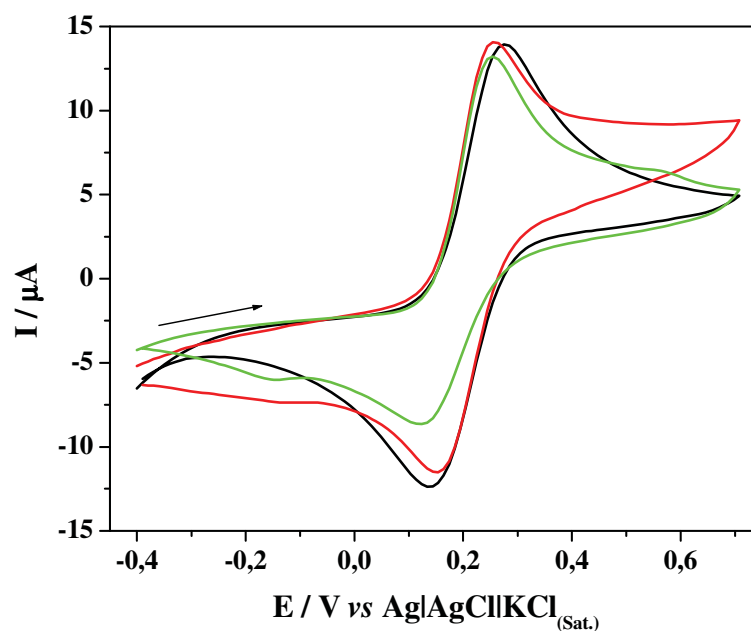
Como mostrado na Tabela 7, as bordas interna e externa do CD MAM-A apresentam altura, espessura e rugosidade das trilhas semelhantes, mas a distância entre as trilhas não se apresenta constante. Já o meio do CD mostra diferença significativa em todos os parâmetros quando comparado com as demais regiões do CD. Esse comportamento demonstra que, provavelmente, o filme de ouro depositado não é uniforme. E isso poderia explicar a falta de repetibilidade que esta superfície apresenta em equipamentos com alta sensibilidade, como na técnica de EIS.

**Tabela 7.** Parâmetros obtidos através de imagens de AFM para cada região do CD MAM-A.

| CD MAM-A        | Borda interna | Meio        | Borda externa |
|-----------------|---------------|-------------|---------------|
| Altura / nm     | 135 ± 4       | 114 ± 4     | 140 ± 3       |
| Trilha / nm     | 0,41 ± 0,03   | 0,33 ± 0,01 | 0,41 ± 0,01   |
| Cavidade / nm   | 0,22 ± 0,02   | 0,08 ± 0,01 | 0,13 ± 0,02   |
| Rugosidade / nm | 49,5          | 45,6        | 50,4          |

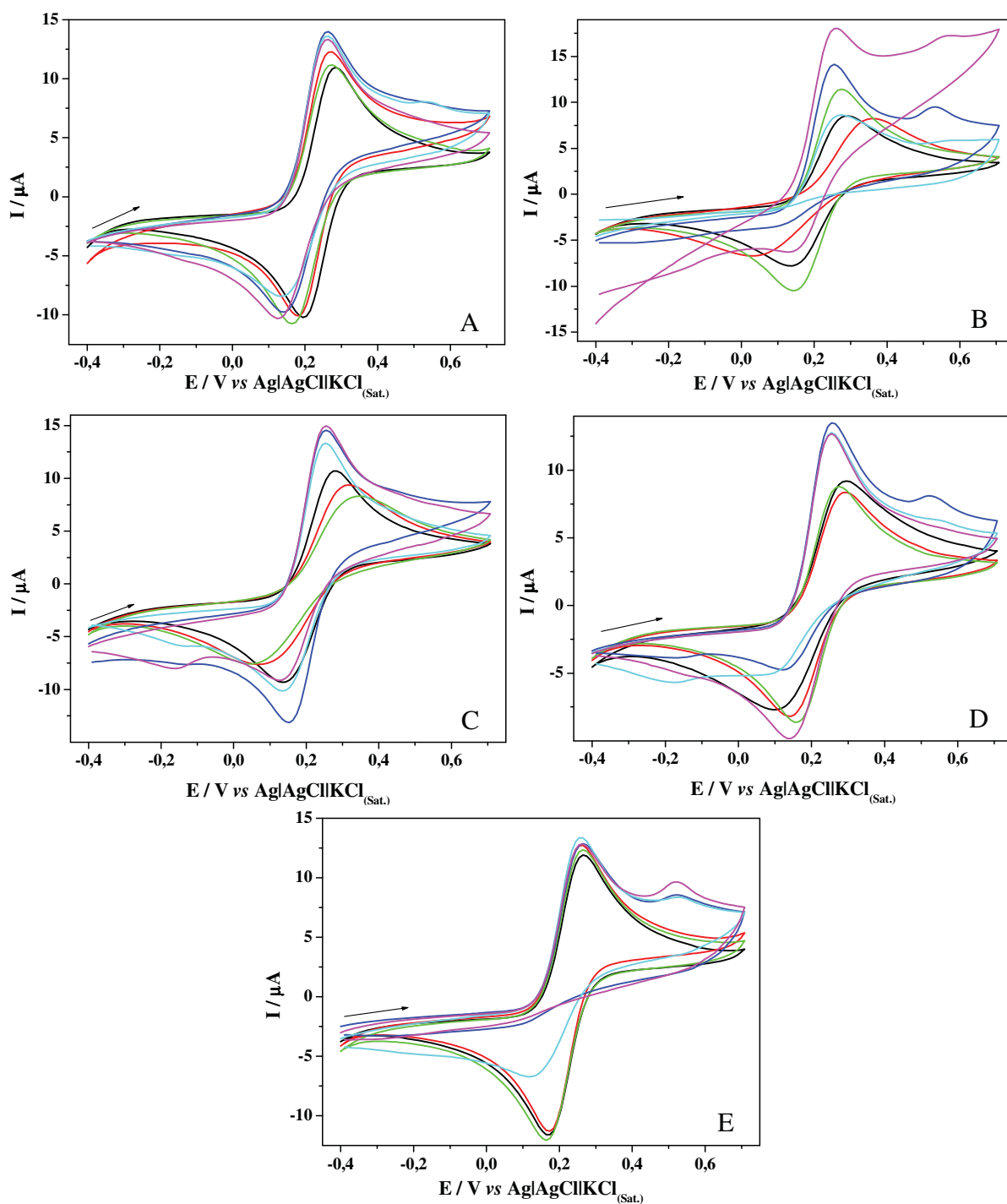
#### **4.3 Estudo do tempo de incubação e concentração da solução de p-ATP para a formação da SAM sobre a superfície do CDtrodo empregando voltametria cíclica**

Inicialmente, foram estudados dois diferentes tempos de incubação da solução de p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  sobre a superfície do CDtrodo, 15 e 30 min. E como mostrado na Figura 18, o tempo de 15 minutos não apresentou grande alteração nos picos de oxiredução do  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ , provavelmente por não haver tempo suficiente para a formação e organização da monocamada. Por essa razão, adotou-se o tempo de 30 minutos de incubação, já que apresentou maior variação no perfil voltamétrico do par redox, principalmente no pico catódico. Tempos maiores de incubação não foram avaliados devido à rápida evaporação do etanol empregado como solvente da solução de p-ATP.



**Figura 18.** Voltamogramas cíclicos em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do CDtrodo de ouro sem modificação (—) e do CDtrodo modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  com 15 (—) e 30 (—) min de incubação vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Depois de fixado o tempo de incubação, foi avaliada a melhor concentração da solução de p-ATP com cinco diferentes concentrações:  $1 \times 10^{-3}$ ;  $2 \times 10^{-3}$ ;  $1 \times 10^{-2}$ ;  $2 \times 10^{-2}$  e  $2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ . No entanto, como observado na Figura 19, a voltametria cíclica não se mostrou um bom método para este estudo, pois o sistema não apresentou boa reprodutibilidade e linearidade nos resultados, ou seja, com o aumento da concentração de p-ATP não houve a redução ou aumento linear do recobrimento da superfície.

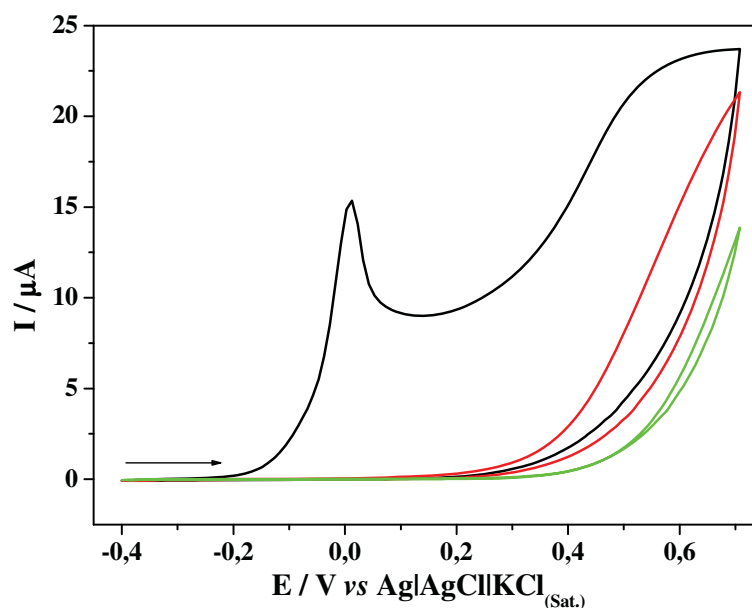


**Figura 19.** Voltamogramas cíclicos em solução de  $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  dos CDtrods de ouro sem modificação: Eletrodo 1 (—), Eletrodo 2 (—) e Eletrodo 3 (—); e dos CDtrods modificados com p-ATP com 30 minutos de incubação, nas seguintes concentrações:  $1 \times 10^{-3}$  (A),  $2 \times 10^{-3}$  (B),  $1 \times 10^{-2}$  (C),  $2 \times 10^{-2}$  (D),  $2 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$  (E): Eletrodo 1 (—), Eletrodo 2 (—) e Eletrodo 3 (—) vs  $\text{Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat.})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.4 Comportamento eletroquímico do p-ATP em solução e modificado na superfície do CDtrodo

Como houve aumento da intensidade de corrente no pico de oxidação quando o CDtrodo foi modificado com p-ATP, foram realizados ciclagens sucessivos do CDtrodo sem modificação com o p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com a finalidade de observar se o composto possui algum pico na mesma região que o par redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ . E, como apresentado na Figura 20, existe um pico de oxidação em aproximadamente 0 V, referente a adsorção do composto tiolado à superfície. Provavelmente quando o p-ATP está modificado na superfície este pico se desloca e se associa com o pico de oxidação do par redox (aproximadamente 260 mV), aumentando a intensidade de corrente.

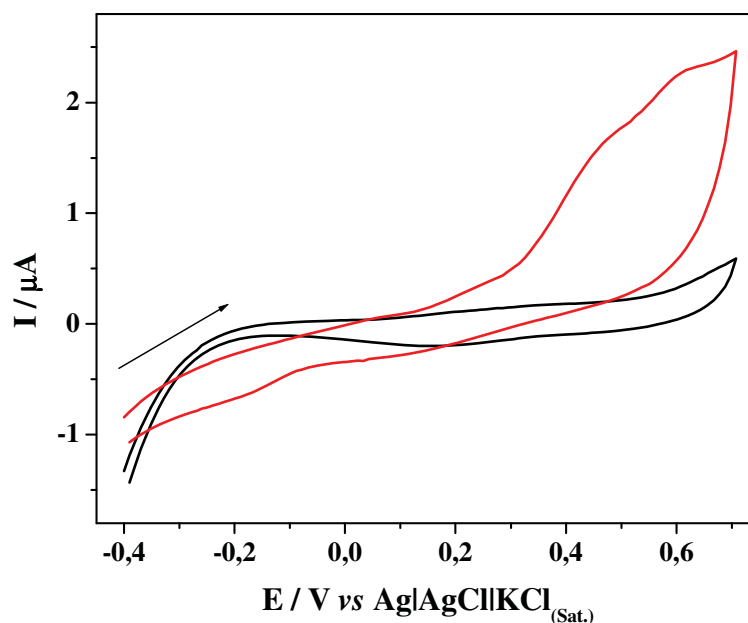
Outra observação interessante é a forte interação que a molécula de p-ATP possui com o ouro, pois, após o primeiro ciclo, o CDtrodo não apresentou mais o pico próximo a 0 V, o que demonstra o recobrimento da superfície.



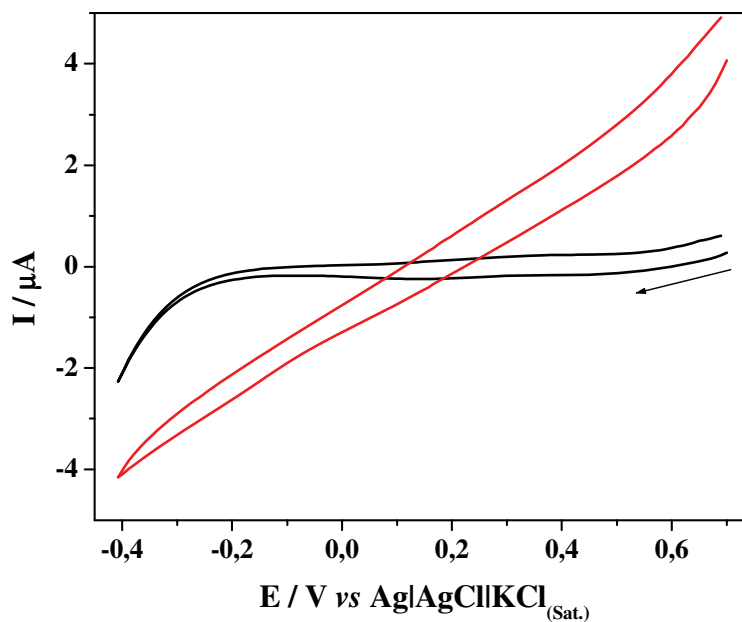
**Figura 20.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 contendo p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  do CDtrodo de ouro sem modificação, sendo: (—) 1º ciclo, (—) 2º ciclo e (—) 10º ciclo vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Também foram realizados experimentos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com o CDtrodo modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e intervalos de potencial de  $-0,4$  a  $+0,7 \text{ V}$  e de  $+0,7$  a  $-0,4 \text{ V}$ . Como mostrado nas Figuras 21 e 22, não houve formação de picos, nos sentidos anódicos e catódicos da varredura, no entanto, houve alteração do perfil voltamétrico em relação ao branco em ambos os intervalos. O voltamograma traçado com o

CDtrodo modificado (Figura 22) apresentou comportamento anômalo na triplica de experimentos realizados e estudos posteriores devem ser efetuados.



**Figura 21.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 do CDtrodo de ouro sem modificação (—) e modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  (—) com intervalo de potencial de  $-0,4$  a  $+0,7 \text{ V vs Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

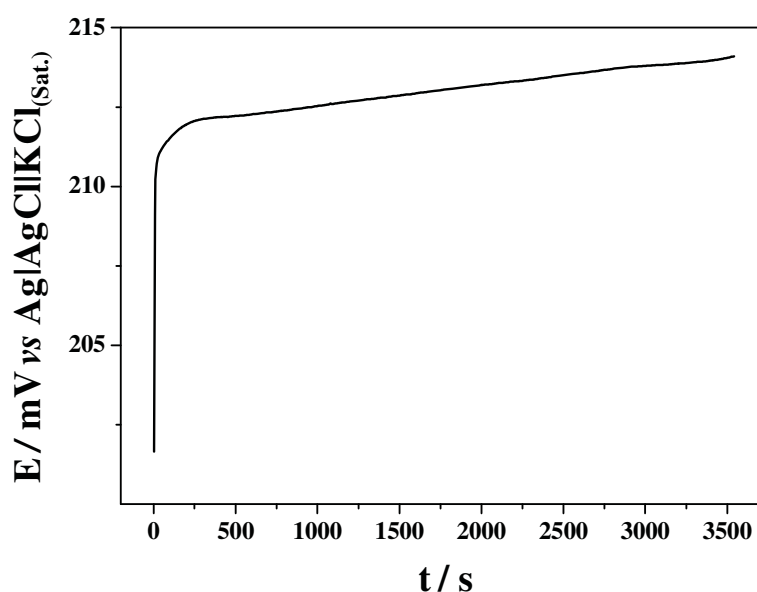


**Figura 22.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 do CDtrodo de ouro sem modificação (—) e modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  (—), com intervalo de potencial de  $+0,7$  a  $-0,4 \text{ V vs Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ ;  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.5 Otimização dos parâmetros a serem empregados nas medidas de EIS

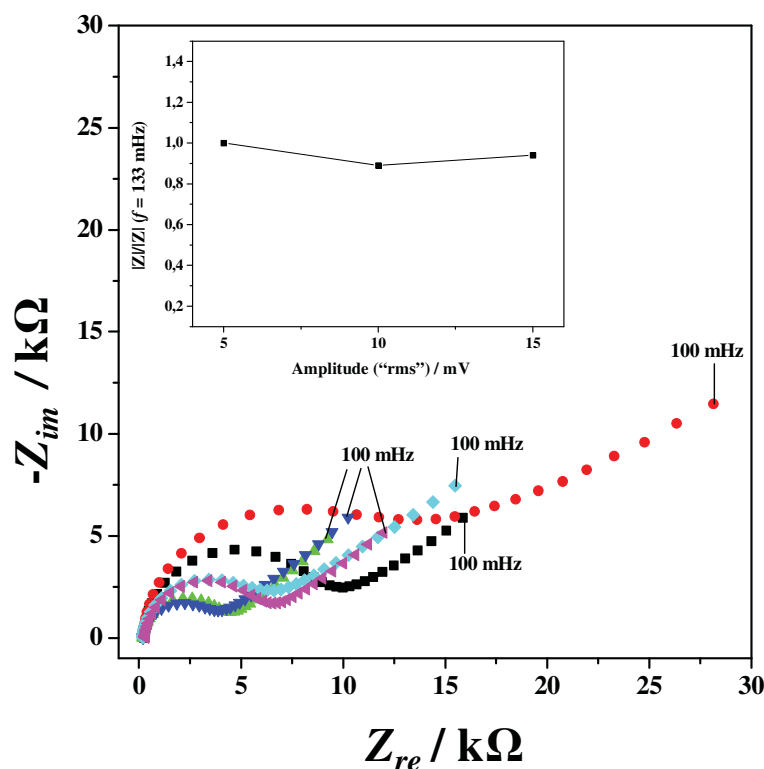
Como não foi possível otimizar a formação da SAM de p-ATP sobre a superfície do CDtrodo através da técnica de voltametria cíclica, optou-se realizar esta otimização empregando a espectroscopia de impedância eletroquímica. Porém, foi necessário estudar previamente as principais condições a serem fixadas nas medidas de EIS.

A Figura 23 mostra a medida potencial *versus* tempo em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Observa-se que nos segundos iniciais o potencial sofreu um salto de aproximadamente 10 mV e, em seguida, há apenas uma pequena variação (cerca de 2 mV) em praticamente 1 hora. Com isso adotou-se 15 minutos como tempo de estabilização do potencial a circuito aberto.



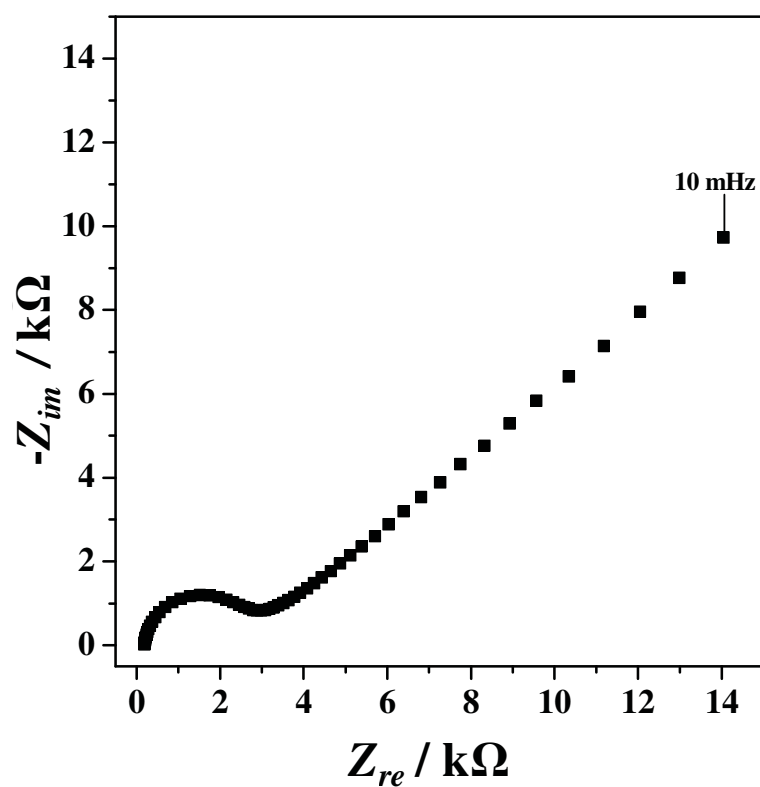
**Figura 23.** Curva de potencial de circuito aberto *versus* tempo obtida para um CDtrodo sem modificação em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  vs  $\text{Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ .

Para estudar a melhor amplitude de perturbação do sistema utilizou-se CDtrodos modificados com ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  empregando três diferentes valores de amplitude (“rms”): 5, 10 e 15 mV. Como observado na Figura 24, as medidas de impedância com amplitude “rms” de 5 mV não apresentaram boa reprodutibilidade entre os eletrodos e quando foram aplicadas as amplitudes “rms” de 10 e 15 mV as medidas mostraram-se reprodutivas, o que indica que o sistema responde à linearidade nestas amplitudes. O “inset” da Figura 24 mostra o módulo de impedância na frequência de 133 mHz vs amplitude (“rms”) / mV, indicando a linearidade do sistema. As etapas posteriores foram realizadas com amplitude “rms” igual a 10 mV.

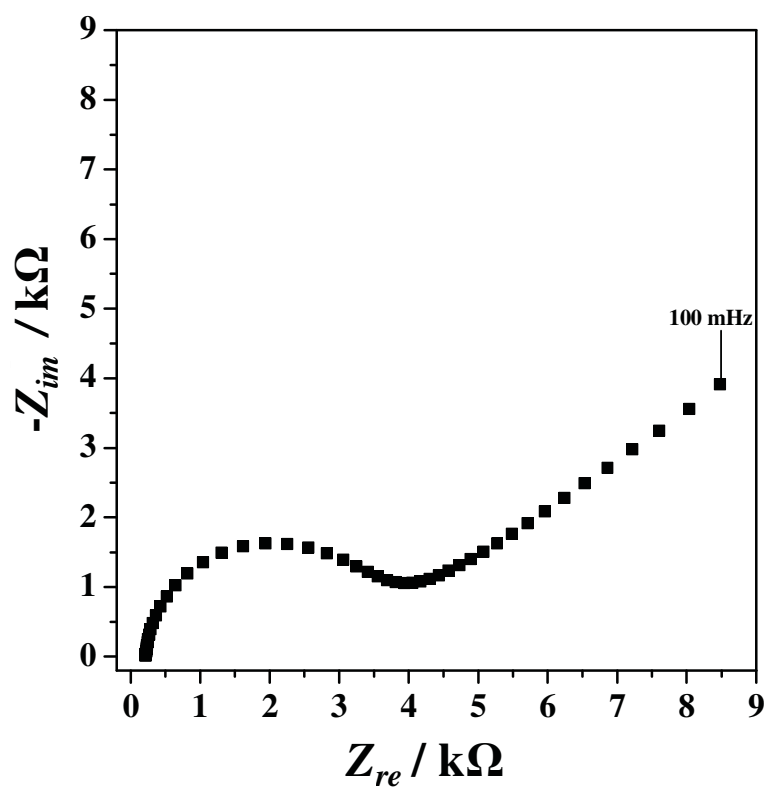


**Figura 24.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo modificados com ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , com diferentes valores de amplitude de perturbação: 5 (■ e ●), 10 (▲ e ▼) e 15 mV (◆ e ▼) vs  $\text{Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ . Inset: módulo de impedância na frequência de 133 mHz vs amplitude ("rms") / mV

Em seguida, foi realizado o estudo do intervalo de frequência. A Figura 25 apresenta o diagrama do plano complexo do CDtrodo sem modificação com intervalo de 10 mHz a 100 kHz e pode-se observar que o processo difusional (em baixas frequências) é muito grande, dificultando a análise do gráfico. Por essa razão, como mostrado na Figura 26, reduziu-se o intervalo de frequência para facilitar a interpretação dos resultados. Portanto adotou-se 100 mHz a 100 kHz como o melhor intervalo de frequência.



**Figura 25.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação com intervalo de frequência de 100 kHz a 10 mHz vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>.



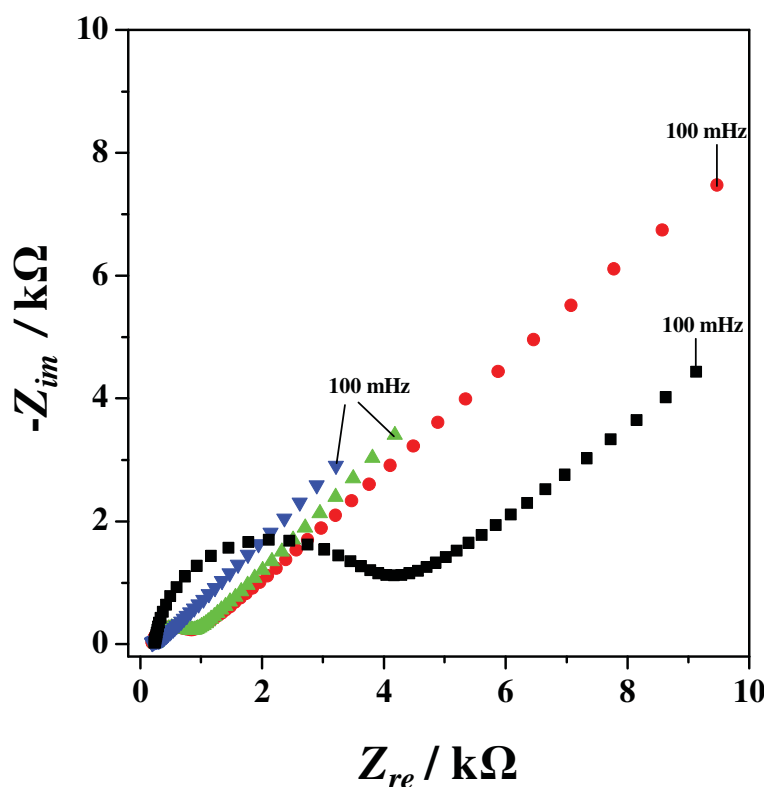
**Figura 26.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação com intervalo de frequência de 100 kHz a 100 mHz vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>.

#### 4.6 Estudos das melhores condições para a formação da SAM de p-ATP

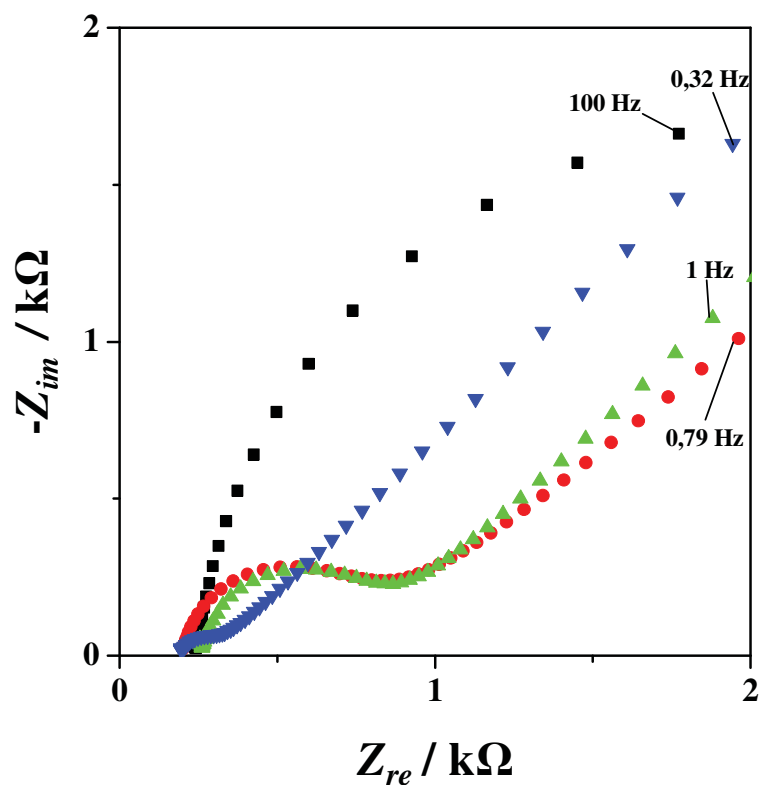
Para a determinação do melhor tempo de incubação da solução de p-ATP foram empregados três diferentes tempos: 30, 60 e 120 min. Devido à rápida evaporação do etanol empregado para solubilizar o p-ATP, durante a incubação foram adicionados mais 50  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto em intervalos de 30 minutos na superfície do CDtrodo para permitir a auto-organização molecular.

Conforme observado na Figura 27 e na ampliação da região referente às frequências mais altas na Figura 28, o melhor tempo de incubação foi de 60 minutos, já que em 30 minutos praticamente há somente o processo difusional e em 120 minutos o processo difusional é superior ao de 30 minutos.

Cabe ressaltar que a impedância do eletrodo modificado é menor do que a do eletrodo sem modificação, possivelmente devido à geometria da molécula de p-ATP que permite a ressonância molecular pela presença do anel aromático na sua estrutura, facilitando de transferência eletrônica e, conseqüentemente, diminuindo a resistência de transferência de elétrons das espécies redox  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  presentes no eletrólito de suporte.

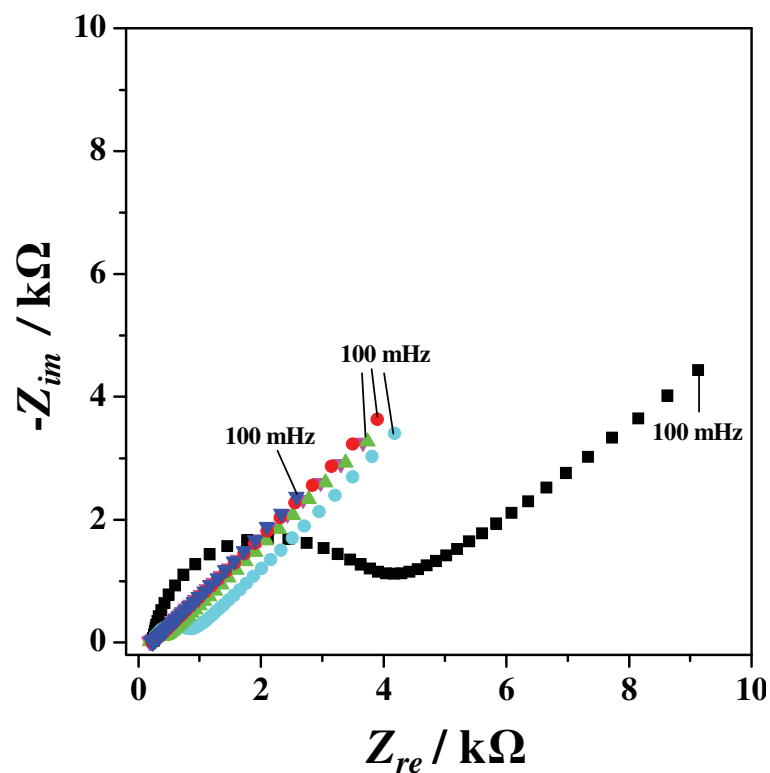


**Figura 27.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  para CDtrodo sem modificação (■) e modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2}$  mol  $\text{L}^{-1}$  com 30 (●), 60 (▲) e 120 min (▼) de incubação vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$ .

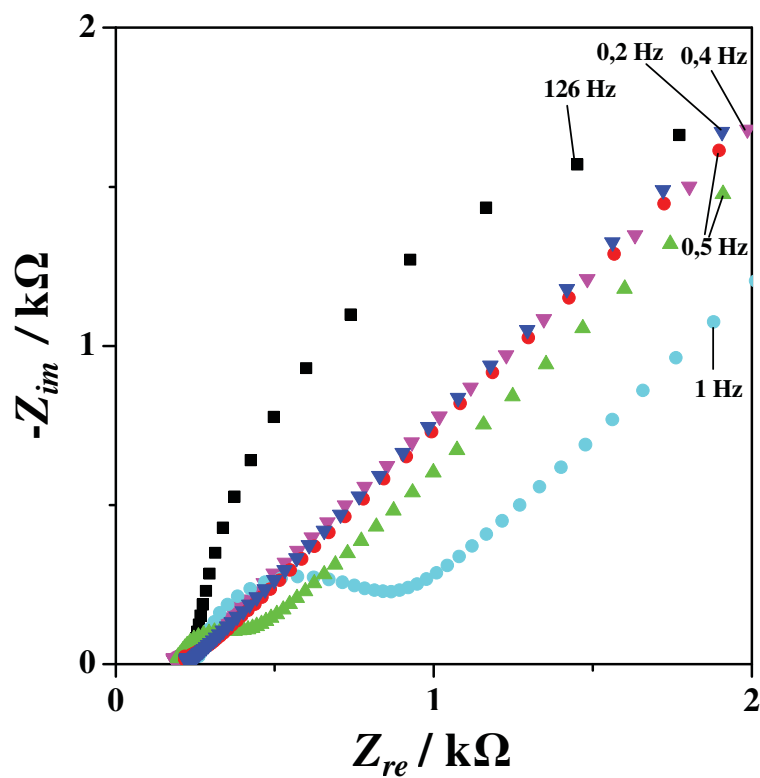


**Figura 28.** Ampliação da região de altas frequências da Figura 27.

Foram avaliadas cinco diferentes concentrações de p-ATP:  $1 \times 10^{-1}$ ,  $2 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-2}$  e  $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Observa-se na Figura 29 e na ampliação da região referente às frequências mais altas na Figura 30, que a única concentração que apresentou uma melhor caracterização dos processos cinético e difusional foi  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . As demais concentrações apresentaram praticamente somente o processo difusional e por essa razão adotou-se a concentração de  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .



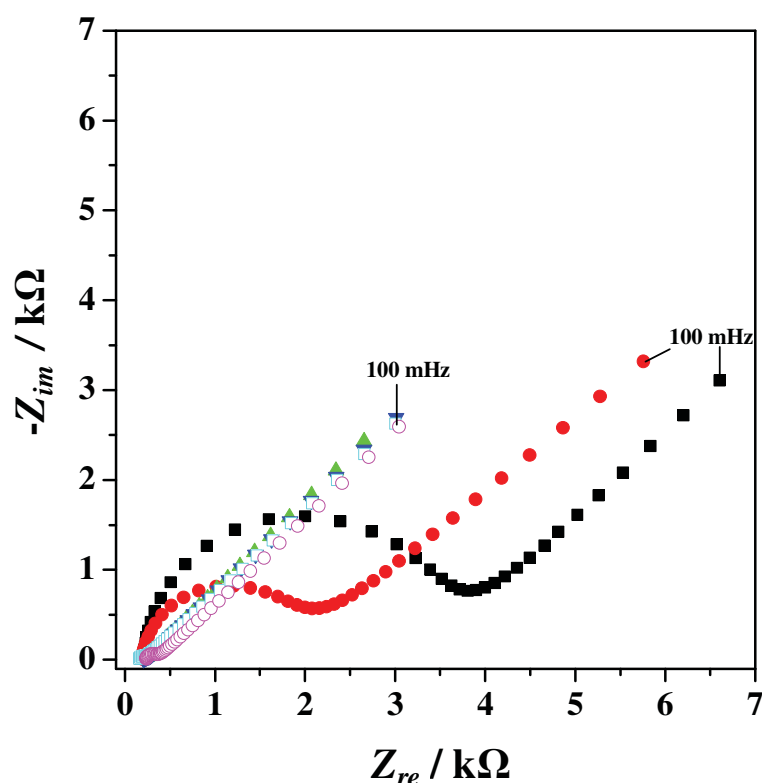
**Figura 29.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■) e modificado com p-ATP 1 x 10<sup>-1</sup> (●); 2 x 10<sup>-1</sup> (▲); 1 x 10<sup>-2</sup> (▼); 2 x 10<sup>-2</sup> (●) e 2 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (▼) com 60 de incubação vs AgI/AgCl/KCl<sub>(sat)</sub>.



**Figura 30.** Ampliação da região de altas frequências da Figura 29.

#### 4.7 Imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> sobre a SAM de p-ATP

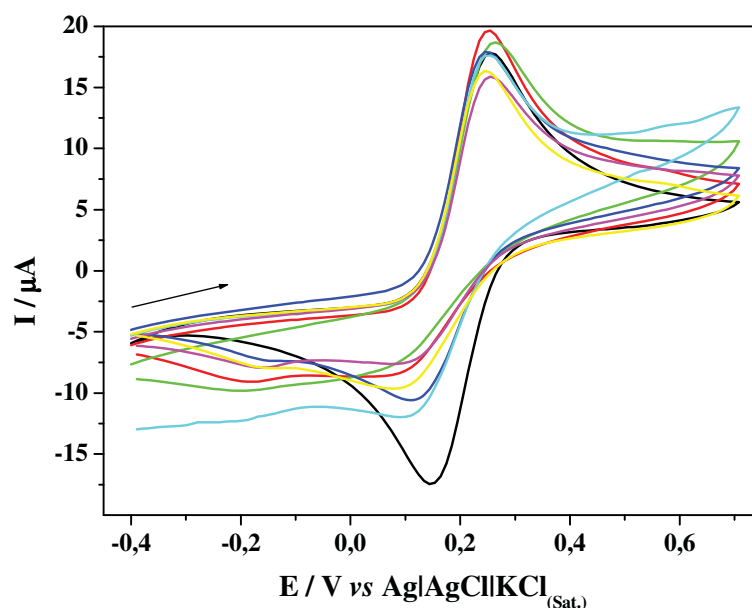
Para verificar se o aumento do tempo de incubação proporciona melhor imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> sobre a SAM de p-ATP foram estudados diferentes tempos de incubação do Ac. A Figura 31 mostra que independente do tempo de incubação do Ac, a impedância do sistema que inclui o CDtrodo modificado apenas com SAM de p-ATP é maior que na presença do anticorpo imobilizado sobre a monocamada. Esperava-se um aumento da impedância com a imobilização dos anticorpos anti-AFB<sub>1</sub>, ou seja, um maior bloqueio da superfície com a presença das imunoglobulinas sobre a SAM de p-ATP.



**Figura 31.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), CDtrodo modificado com p-ATP 2 x 10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> (●) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM com tempos de incubação de 1 (▲), 3 (▼), 12 (□) e 18 h (○) vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>.

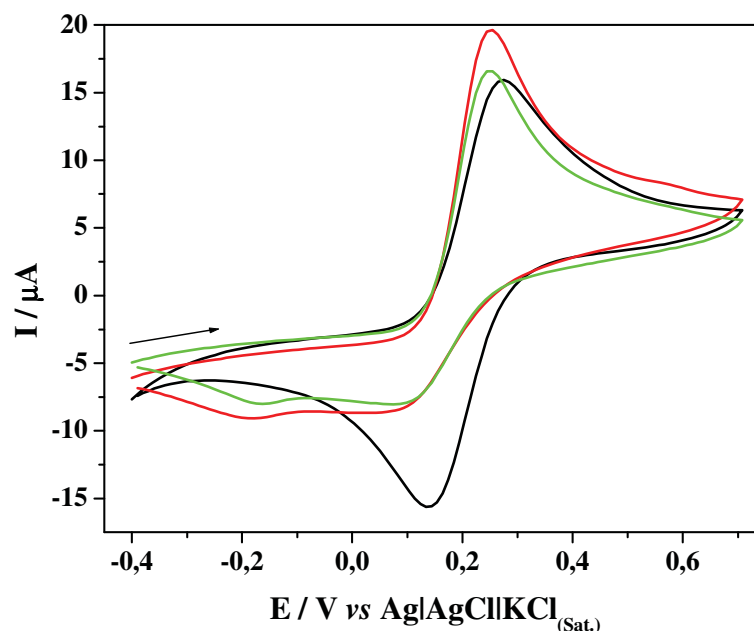
Mediante os resultados obtidos, CDtrodos com diferentes tempos de incubação da solução de anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> também foram avaliados através da voltametria cíclica (Figura 32). E assim como nas medidas de EIS, concluiu-se que o anticorpo não está sendo imobilizado na SAM de p-ATP, pois o comportamento voltamétrico do eletrodo imobilizado com o Ac é muito próximo ao eletrodo modificado apenas com p-ATP, independente do tempo de incubação empregado. Uma possível explicação seria devido ao valor do pH da

solução de Ac, pois o grupo amino estaria com carga positiva e dificultaria a interação como o Ac.



**Figura 32.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do CDtrodo sem modificação (—), modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  (—) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM com tempos de incubação de 1 (—), 6 (—), 10 (—), 12 (—) e 18 h (—) vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat.)</sub>.

Era esperado que ocorresse uma ligação do grupo amino do p-ATP com o grupo carboxílico terminal da porção F<sub>c</sub> do anticorpo, simulando uma ligação peptídica. Provavelmente essa reação não ocorre de maneira espontânea e, por essa razão, ativou-se o grupo carboxílico do Ac com uma carbodiimida (EDC), como apresentado na Figura 33. No entanto, a imobilização também se mostrou ineficiente, pois houve pequena alteração do perfil voltamétrico na presença do par redox quando o anticorpo está imobilizado na superfície de ouro na presença de EDC em relação ao perfil do CDtrodo modificado apenas com p-ATP. Diante destes fatos, a alternativa buscada foi investigar outros compostos que propiciem a imobilização do anticorpo de maneira estável e orientada.



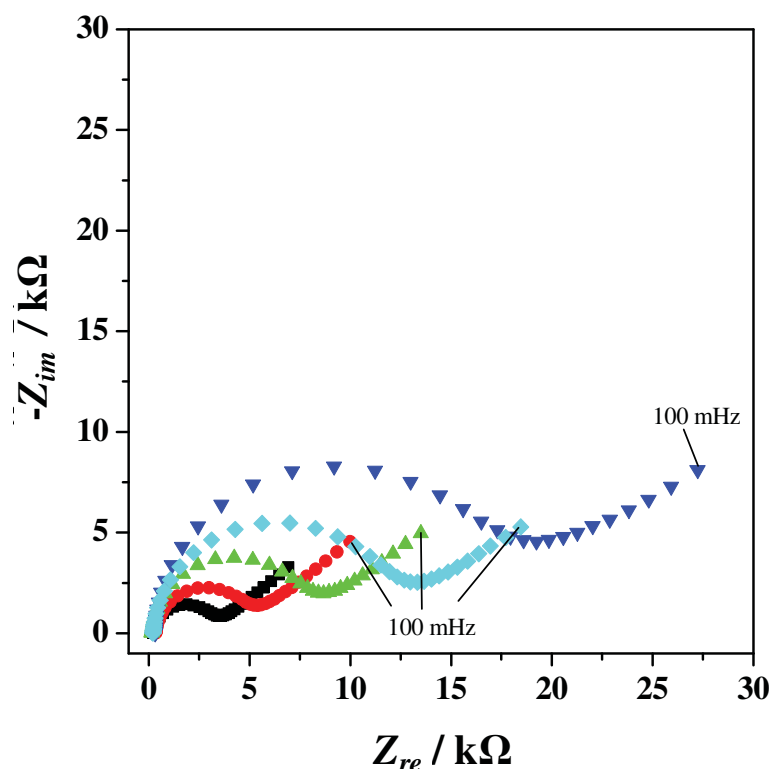
**Figura 33.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do CDtrodo sem modificação (—), modificado com p-ATP  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  (—) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> + EDC  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  imobilizado sobre a SAM com 3 h de incubação (—) vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat.})}$ .

#### 4.8 Investigação da imobilização da proteína A sobre a superfície de ouro

Devido à alta interação da proteína A com a porção F<sub>c</sub> do anticorpo, a superfície de ouro do CDtrodo foi modificada com esta proteína para verificar a eficiência na imobilização do anticorpo sobre a camada protéica.

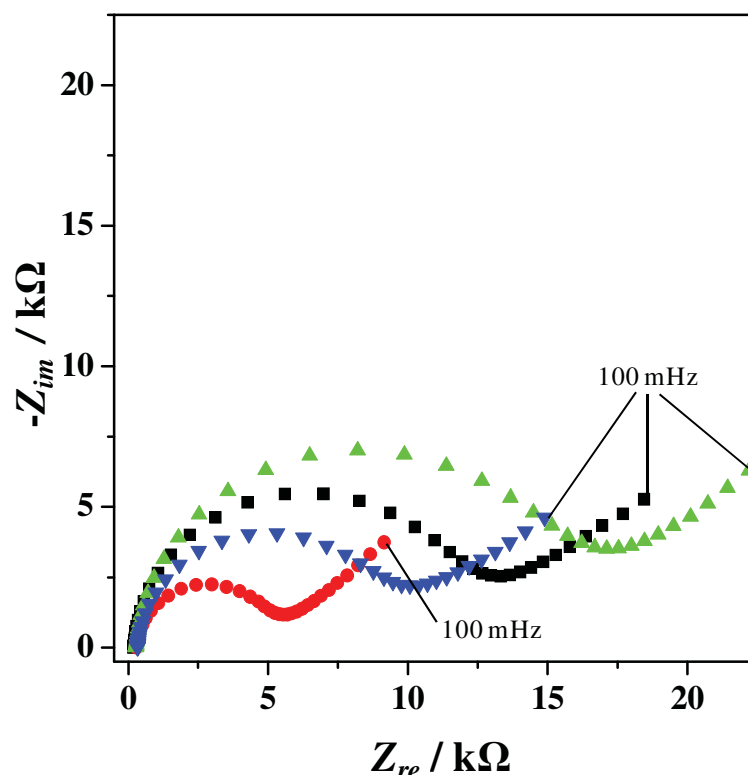
Suri *et al.*<sup>35</sup> imobilizou a proteína A  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  sobre um eletrodo de ouro com incubação de 2 horas e seguiu com as demais modificações, incluindo a imobilização de um anticorpo sobre a proteína A.

Como estudos preliminares da imobilização da proteína A, empregou-se a concentração de  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  e adicionou a proteína diretamente sobre a superfície de ouro e sobre a SAM ativada de ácido lipóico, ambas com incubação de 3 horas. Observou-se que empregando os dois métodos de modificação ocorreu aumento de impedância (Figura 34) quando comparado ao eletrodo sem modificação, o que mostra que ocorreu a imobilização da proteína A. Quando a proteína A foi adicionada sobre a SAM apresentou uma maior impedância que a proteína imobilizada diretamente na superfície do eletrodo. Esse comportamento deve-se ao fato de um maior bloqueio da superfície de trabalho contendo a SAM + Proteína A.



**Figura 34.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo sem modificação (■), modificado com ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (●); com o grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (▲), com a proteína A  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  imobilizada sobre a SAM ativada com tempo de incubação de 3 h (▼) e com a proteína A  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  imobilizada diretamente sobre o CDtrodo com tempo de incubação de 3 h (◆).

Na etapa subsequente, foi analisada a estabilidade da proteína A diretamente sobre a superfície de ouro. Para isso, foram adicionadas as seguintes soluções sobre a superfície de diferentes CDtrodos modificados com a proteína: solução tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, anticorpo anti- $\text{AFB}_1$  1:2000 e o antígeno  $\text{AFB}_1$  diluído em solução de BSA, todas com 12 horas de incubação. Como pode ser observado na Figura 35, ocorreu a diminuição da impedância quando a solução tampão e o anticorpo foram adicionados na superfície do eletrodo modificado, mostrando que houve a lixiviação da proteína A. Já quando a solução de antígeno foi adicionada, houve aumento da impedância. No entanto esse aumento, provavelmente, deve-se ao bloqueio da superfície proporcionada pela BSA presente na solução. Em decorrência da fraca interação da proteína A, que facilmente se lixívia da superfície de ouro, descartou-se o uso desta molécula para o desenvolvimento do imunossensor.

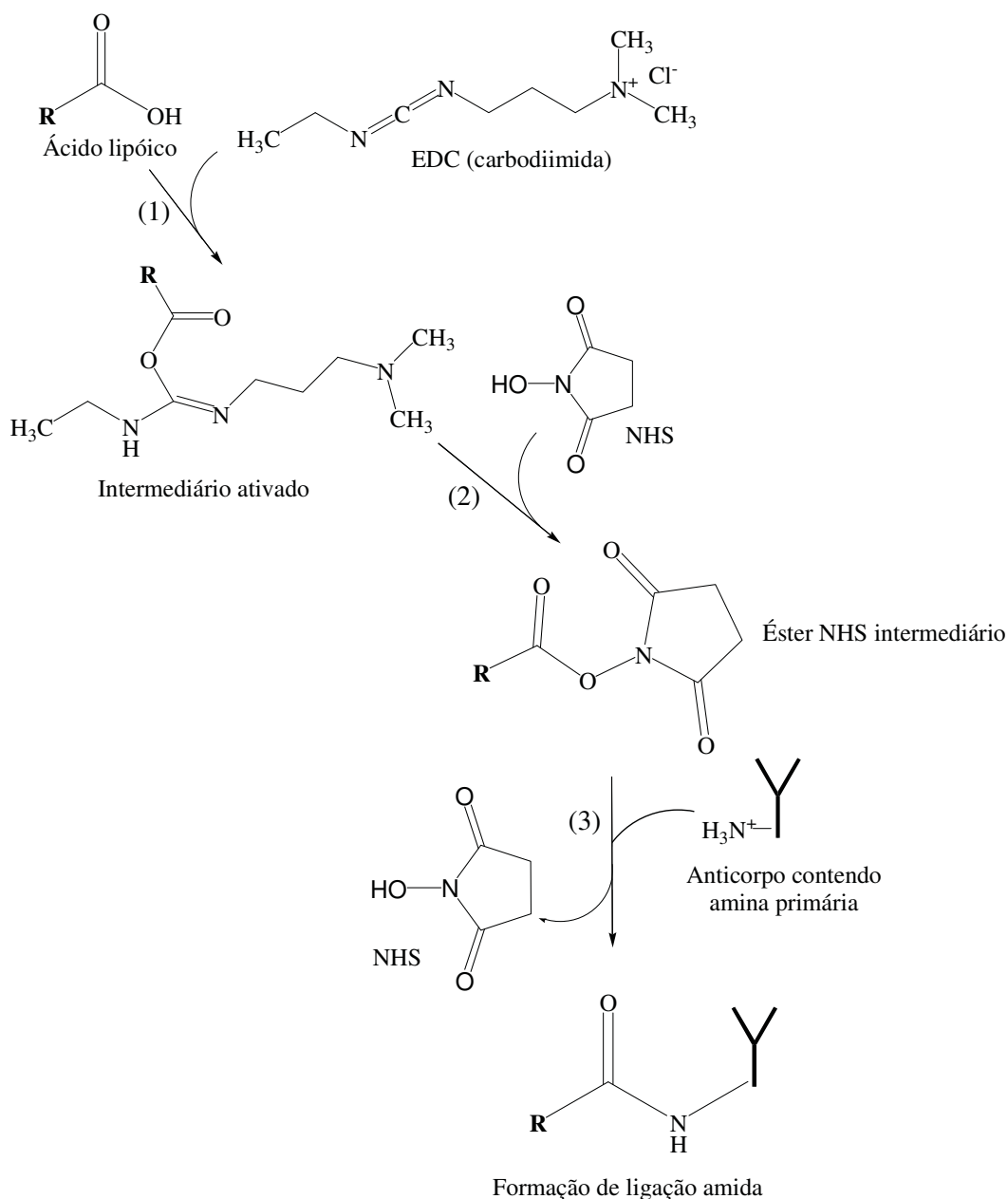


**Figura 35.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo modificado somente com a proteína A  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  sobre o ouro (■), e para os CDtrodos modificados com a proteína A com adição de solução tampão  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 por 12 h (●), adição do antígeno  $\text{AFB}_1$   $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  por 12 h (▲) e com adição de  $\text{Ac-AFB}_1$  1:2000 por 12 h (▼).

#### 4.9 Imobilização do anticorpo anti- $\text{AFB}_1$ sobre a SAM de ácido lipóico

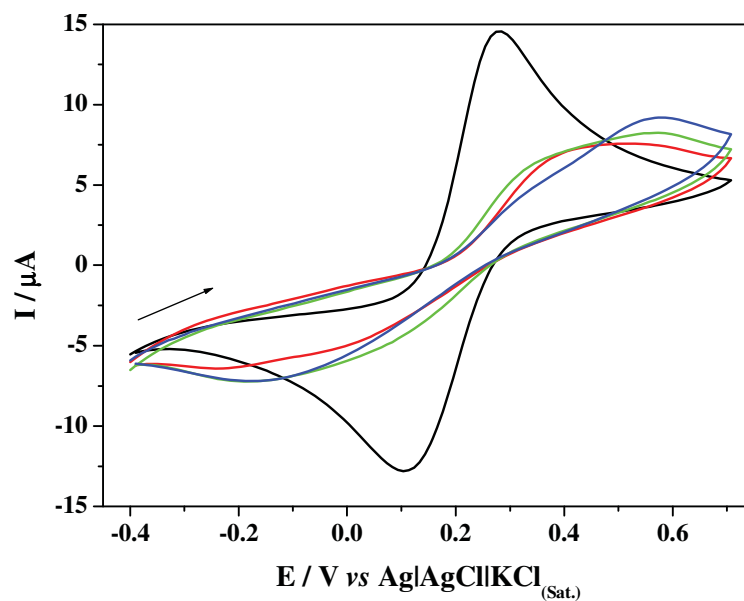
O ácido lipóico tem sido empregado no grupo de pesquisa para a formação da SAM e o EDC/NHS foram utilizados como ativadores do grupo carboxílico desta monocamada<sup>59</sup>.

O Esquema 2 mostra o mecanismo de ativação da monocamada carboxílica via EDC/NHS<sup>63</sup>. Onde o EDC reage com o grupo carboxílico do ácido lipóico para formar um éster ativo abandonador (1). No entanto, este complexo reativo está sujeito a rápida hidrólise em soluções aquosas, apresentando taxas de constantes medidas em segundos. Assim se a amina do anticorpo que se ligará ao ácido lipóico não encontrar o grupo carboxílico ativo antes da hidrólise, o acoplamento desejado não ocorrerá. Mas a formação de um éster-NHS intermediário da reação do grupo hidroxila do NHS com o complexo de éster-EDC ativado (2) aumenta o tempo de meia vida do carboxilato ativado para horas. Entretanto, o produto final dessa reação em duas etapas é idêntico ao obtido usando apenas o EDC: o carboxilato ativado reage com uma amina da cadeia lateral do anticorpo formando uma ligação amida estável (3).



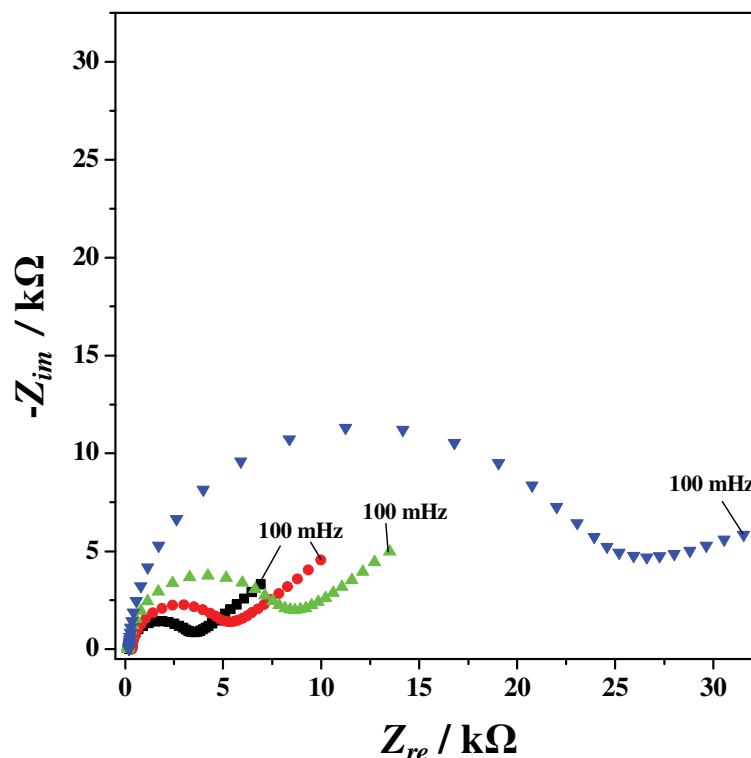
**Esquema 2.** Reação de acoplamento da do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> a SAM de ácido lipóico por meio da EDC/NHS<sup>60, 63</sup>.

A Figura 36 apresenta as voltametrias cíclicas das diferentes etapas de modificação: formação da SAM de ácido lipóico, ativação do grupo carboxílico e imobilização do anticorpo. Como há uma grande deformação do perfil voltamétrico do eletrodo modificado com ácido lipóico, as demais modificações não foram tão perceptivas através da voltametria cíclica.



**Figura 36.** Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do CDtrodo sem modificação (—), modificado com ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (—), com o grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (—) e o anticorpo anti- $\text{AFB}_1$  imobilizado sobre a SAM ativada com 2 h de incubação (—) vs  $\text{Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ .

Por essa razão, para avaliar as diferentes etapas de modificação do CDtrodo de ouro foi empregada a EIS devido a sua maior sensibilidade. A Figura 37 mostra que a imobilização do anticorpo anti- $\text{AFB}_1$  sobre a SAM de ácido lipóico ativado com EDC/NHS foi eficiente. Pois se observa um aumento de impedância do sistema a partir do eletrodo sem modificação, seguido da ativação e com interação do anticorpo para aflatoxina.



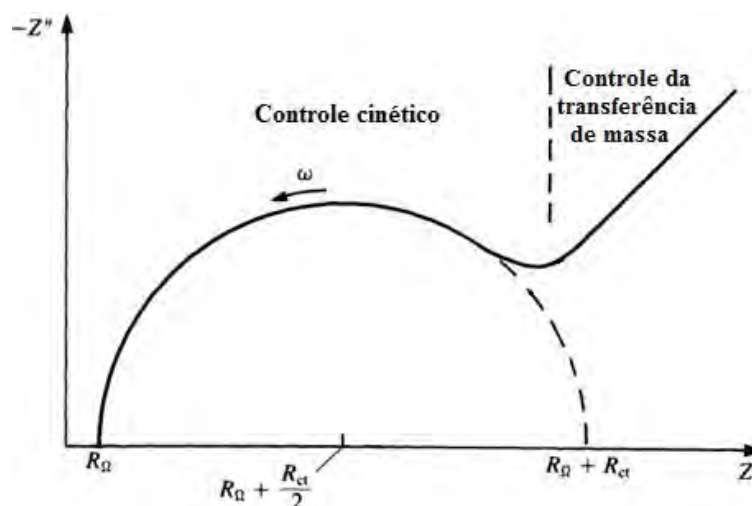
**Figura 37.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 com Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), modificado com ácido lipóico 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (●), com o grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (▲) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM ativada com 2h de incubação (▼) vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>.

#### 4.10 Estudo quimiométrico da concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> sobre SAM de ácido lipóico

Como o ácido lipóico ativado com EDC/NHS apresentou resultados satisfatórios, o planejamento fatorial completo do tipo 2<sup>2</sup> foi utilizado para a otimização da concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>.

O parâmetro empregado para a avaliação quimiométrica foi a resistência de transferência de carga (R<sub>ct</sub>). Esses valores foram obtidos através dos diagramas de Nyquist em cada um dos experimentos. Conforme observado na Figura 38, a impedância real (Z<sub>re</sub>) no centro do semicírculo é igual à resistência da solução (R<sub>Ω</sub>) mais metade da resistência de transferência de carga (R<sub>ct</sub>)<sup>64</sup>. Portanto, pode-se definir o R<sub>ct</sub> como:

$$R_{ct} = 2 Z_{re} - 2 R_{\Omega}$$



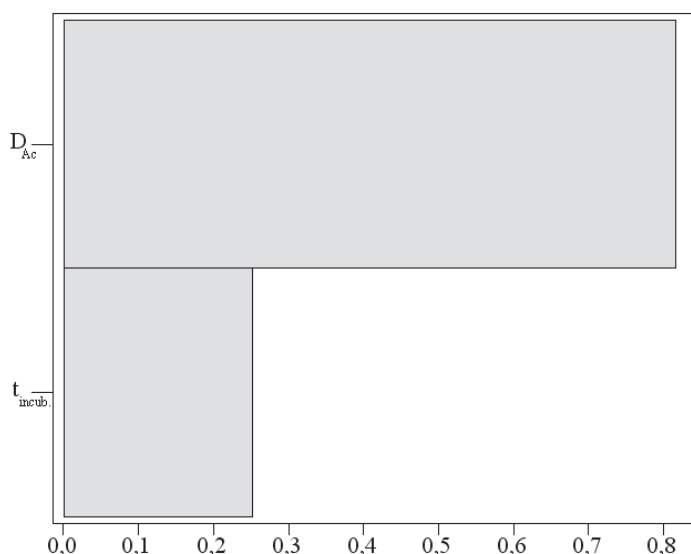
**Figura 38.** Gráfico da impedância em um plano complexo de um sistema eletroquímico simples<sup>64</sup>.

A Tabela 8 apresenta as diversas combinações de experimentos para o planejamento fatorial com os respectivos valores de  $R_{ct}$ .

**Tabela 8.** Matriz de planejamento fatorial completo  $2^2$  e resistências de transferência de carga.

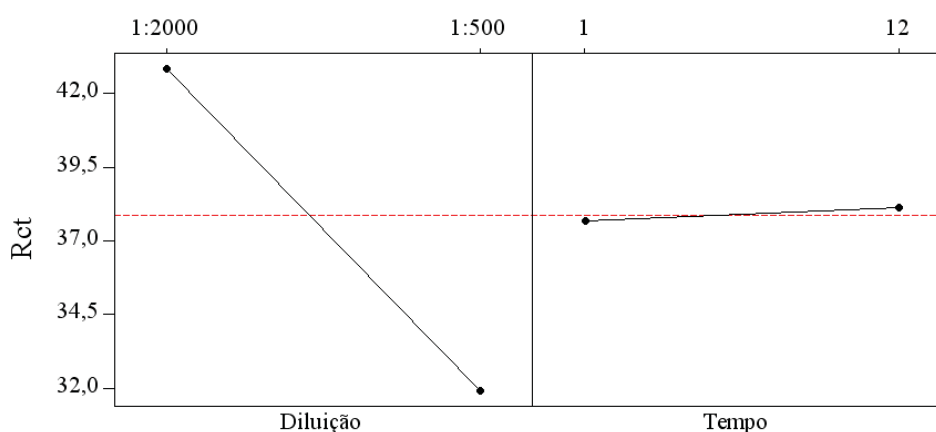
| Experimento | Diluição | $t_{incub.} / h$ | $R_{ct} / k\Omega$ |
|-------------|----------|------------------|--------------------|
| 1           | 1:500    | 1                | 16,8               |
| 2           | 1:2000   | 12               | 49,4               |
| 3           | 1:500    | 1                | 16,0               |
| 4           | 1:2000   | 12               | 55,5               |
| 5           | 1:500    | 1                | 111,1              |
| 6           | 1:2000   | 12               | 69,9               |
| 7           | 1:2000   | 1                | 31,9               |
| 8           | 1:500    | 12               | 6,5                |
| 9           | 1:2000   | 1                | 23,1               |
| 10          | 1:500    | 12               | 9,3                |
| 11          | 1:2000   | 1                | 27,3               |
| 12          | 1:500    | 12               | -                  |

Empregando os resultados da Tabela 8 e aplicando o programa estatístico Minitab<sup>TM</sup> Statistical Software Release 15 foi possível identificar os efeitos de cada parâmetro sobre o sistema. A Figura 39 apresenta o Gráfico de Pareto, onde se observa que o parâmetro mais importante na imobilização do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> é a diluição, enquanto o tempo de incubação da solução não possui grande influência na imobilização.



**Figura 39.** Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do Ac-AFB<sub>1</sub> sobre CDtrodo de ouro modificado com SAM.  $D_{Ac}$  = diluição do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> e  $t_{incub.}$  = tempo de incubação.

As influências dos níveis alto e baixo de cada variável também foram determinadas. As retas apresentadas na Figura 40 expressam a tendência em termos da intensidade da  $R_{ct}$  quando se altera o parâmetro do nível baixo para o alto. Quanto mais inclinada for a reta, maior a influência do parâmetro sobre o sistema, portanto a diluição do anticorpo apresenta maior influência no sistema do que o tempo de incubação. A diluição 1:2000 do anticorpo tende a resultar em maiores valores de  $R_{ct}$ , enquanto o tempo de incubação não apresentou influência significativa. Por essa razão adotou-se o tempo de incubação do anticorpo em 1 hora nos demais experimentos.



**Figura 40.** Tendência da resistência para os níveis alto e baixo de cada variável.

#### **4.11 Imagens de microscopia eletrônica de varredura (FE-SEM) da superfície de ouro com o Ac imobilizado**

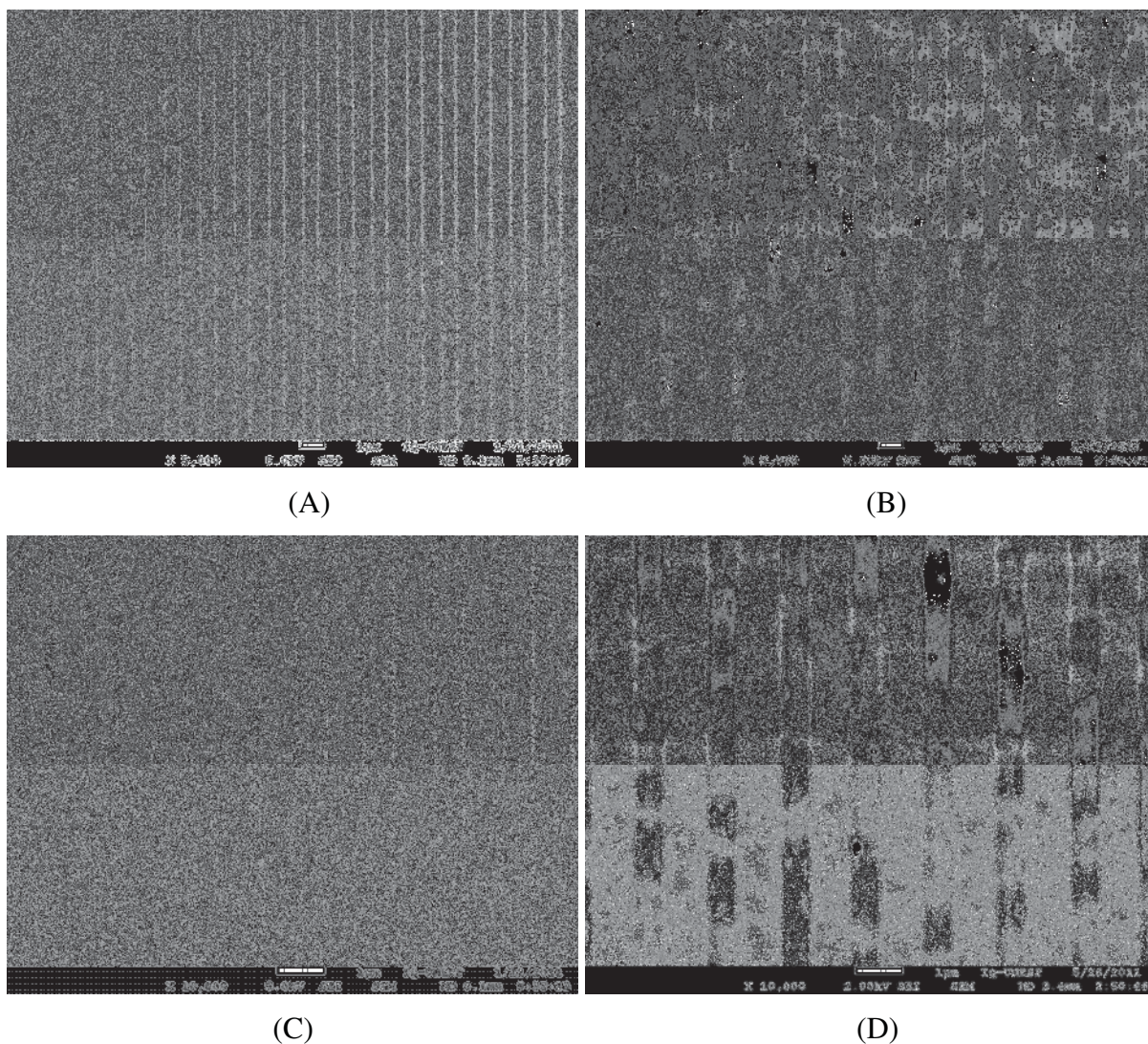
A partir das imagens de FE-SEM da Figura 41 é possível observar a diferença de uma superfície sem modificação e de uma com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a superfície do CD.

Nas Figuras 41-A e 41-C são apresentadas as imagens da superfície de ouro, seguida da limpeza eletroquímica com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nestas imagens observa-se claramente a presença das trilhas de gravação do CD, mostrando que a superfície encontra-se limpa. Já nas imagens da Figura 41-B e 41-D é possível observar aglomerados em toda a superfície do CD, mostrando que o anticorpo apresenta boa imobilização na superfície, tanto nas trilhas como nas cavidades. Observa-se também que existem alguns espaços vazios, ou seja, sem a presença do Ac, onde, possivelmente, encontram-se as moléculas da SAM de ácido lipóico que não interagiram com as moléculas de Ac. E devido a essas vacâncias reforça-se a importância do bloqueio da superfície com BSA.

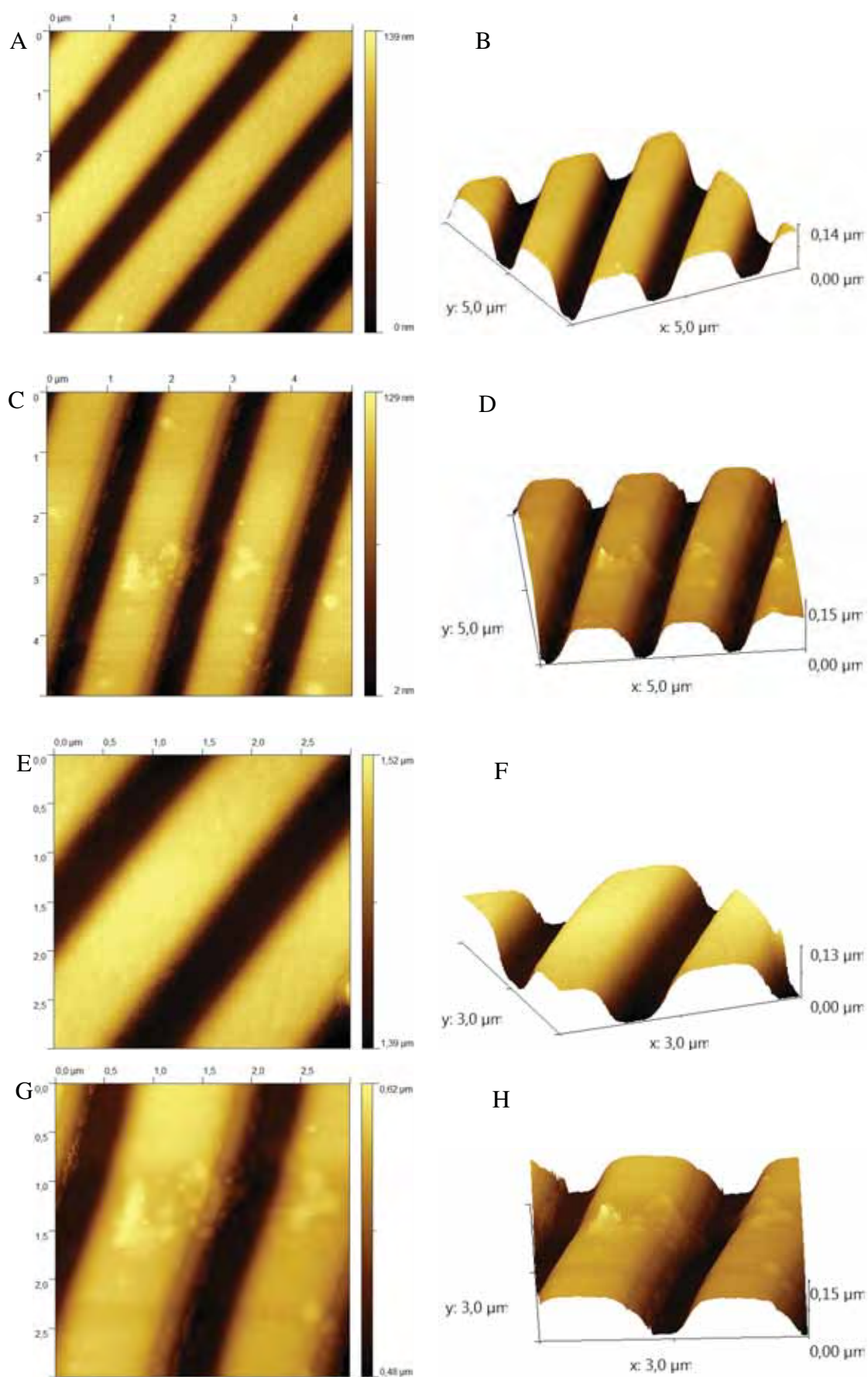
#### **4.12 Imagens de microscopia de força atômica (AFM) do CD trocado com o Ac imobilizado**

As Figuras 42 apresentam as imagens topográficas obtidas por AFM nas escalas 5x5 e 3x3 µm, respectivamente, da superfície de ouro sem modificação (A e C) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM de ácido lipóico (B e D).

A partir destas imagens, observa-se que houve aumento de aproximadamente 1 nm na altura das trilhas do CD devido à imobilização do anticorpo. E, assim como nas imagens de FE-SEM, mostram que a imobilização ocorre em toda a superfície do CD. No entanto, há uma prevalência maior da quantidade de anticorpo na inclinação entre a cavidade e o topo da trilha.



**Figura 41.** Imagens de FE-SEM para a superfície de ouro sem modificação (A) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizado sobre a SAM de ácido lipóico (B) com ampliação de 5.000 × e superfície sem modificação (C) e com o anticorpo imobilizado (D) com ampliação de 10.000 ×.



**Figura 42.** Imagens de AFM do CDtrodo sem modificação (A, B, E, F) e com o anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> imobilizada sobre SAM de ácido lipóico (B, C, G, H): (A, C) 5×5 μm<sup>2</sup>, (B,D) imagem em 3D 5×15 μm<sup>2</sup>, (E, G) 3×3 μm<sup>2</sup>, (F, H) imagem em 3D 3×3 μm<sup>2</sup>.

#### 4.13 Estudo quimiométrico da concentração de BSA, AFB<sub>1</sub> e tempo de incubação do antígeno

Depois de definidas as melhores condições para a imobilização do anticorpo sobre o ácido lipóico ativado, foi estudada, via planejamento fatorial completo do tipo 2<sup>3</sup>, a otimização das concentrações de soroalbumina bovina e aflatoxina B<sub>1</sub> (antígeno) e tempo de incubação do antígeno.

Na Figura 43 é apresentada um esquema da reação do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> com uma molécula de aflatoxina B<sub>1</sub> indicando uma possível interação intermolecular.



**Figura 43.** Esquema da interação do anticorpo anti-aflatoxina B<sub>1</sub> com uma molécula de aflatoxina B<sub>1</sub>.

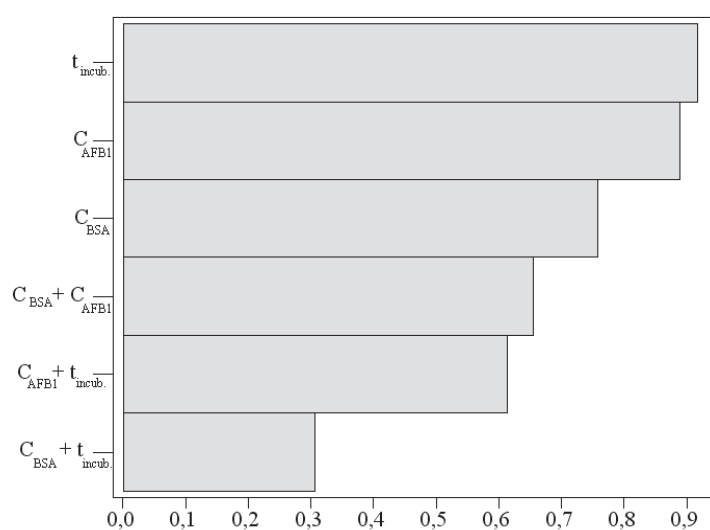
A Tabela 9 apresenta as diversas combinações de experimentos para o planejamento fatorial com os respectivos valores de R<sub>ct</sub>.

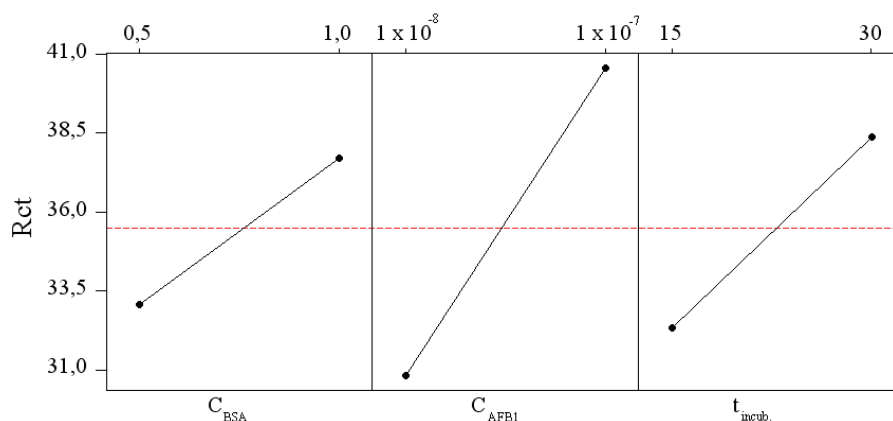
O Gráfico de Pareto da Figura 44 mostra que todos os parâmetros apresentaram influência significativa no sistema, sendo que o tempo de incubação do antígeno apresentou maior importância, seguido da concentração de AFB<sub>1</sub> e concentração de BSA.

O gráfico de tendências da Figura 45 mostrou que o sistema apresenta maiores valores de R<sub>ct</sub> para os níveis mais altos, ou seja, as melhores concentrações de BSA e AFB<sub>1</sub> foram 1,0% e  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente, e o melhor tempo de incubação da AFB<sub>1</sub> é de 30 minutos.

**Tabela 9.** Matriz de planejamento fatorial completo  $2^3$  e resistências de transferência de carga.

| Experimento | $C_{BSA} / \%$ | $C_{AFB1} \times 10^{-8} / \text{mol L}^{-1}$ | $t_{\text{incub.}} / \text{min}$ | $R_{ct} / \text{k}\Omega$ |
|-------------|----------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 1           | 0,5            | 1,0                                           | 15                               | 25,7                      |
| 2           | 1,0            | 10                                            | 15                               | 35,1                      |
| 3           | 1,0            | 1,0                                           | 30                               | 33,1                      |
| 4           | 0,5            | 10                                            | 30                               | 53,8                      |
| 5           | 0,5            | 1,0                                           | 15                               | 30,8                      |
| 6           | 1,0            | 10                                            | 15                               | 75,4                      |
| 7           | 1,0            | 1,0                                           | 30                               | 72,8                      |
| 8           | 0,5            | 10                                            | 30                               | 72,8                      |
| 9           | 0,5            | 1,0                                           | 15                               | 62,4                      |
| 10          | 1,0            | 10                                            | 15                               | 42,0                      |
| 11          | 1,0            | 1,0                                           | 30                               | 23,1                      |
| 12          | 0,5            | 10                                            | 30                               | 28,8                      |
| 13          | 1,0            | 1,0                                           | 15                               | 31,4                      |
| 14          | 0,5            | 10                                            | 15                               | 17,0                      |
| 15          | 0,5            | 1,0                                           | 30                               | 11,3                      |
| 16          | 1,0            | 10                                            | 30                               | 56,4                      |
| 17          | 1,0            | 1,0                                           | 15                               | 11,8                      |
| 18          | 0,5            | 10                                            | 15                               | 8,8                       |
| 19          | 0,5            | 1,0                                           | 30                               | 17,0                      |
| 20          | 1,0            | 10                                            | 30                               | 8,7                       |
| 21          | 1,0            | 1,0                                           | 15                               | 15,1                      |
| 22          | 0,5            | 10                                            | 15                               | -                         |
| 23          | 0,5            | 1,0                                           | 30                               | 35,1                      |
| 24          | 1,0            | 10                                            | 30                               | 47,3                      |

**Figura 44.** Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do antígeno  $AFB_1$  sobre o anticorpo imobilizado sobre a SAM do CDtrodo de ouro.  $C_{BSA}$  = concentração de soroalbumina bovina;  $C_{AFB1}$  = concentração de aflatoxina  $B_1$  e  $t_{\text{incub.}}$  = tempo de incubação da aflatoxina  $B_1$ .



**Figura 45.** Tendência da resistência para os níveis alto e baixo de cada variável.  $C_{BSA}$  = concentração de soroalbumina bovina;  $C_{AFB1}$  = concentração de aflatoxina  $B_1$  e  $t_{incub.}$  = tempo de incubação da aflatoxina  $B_1$ .

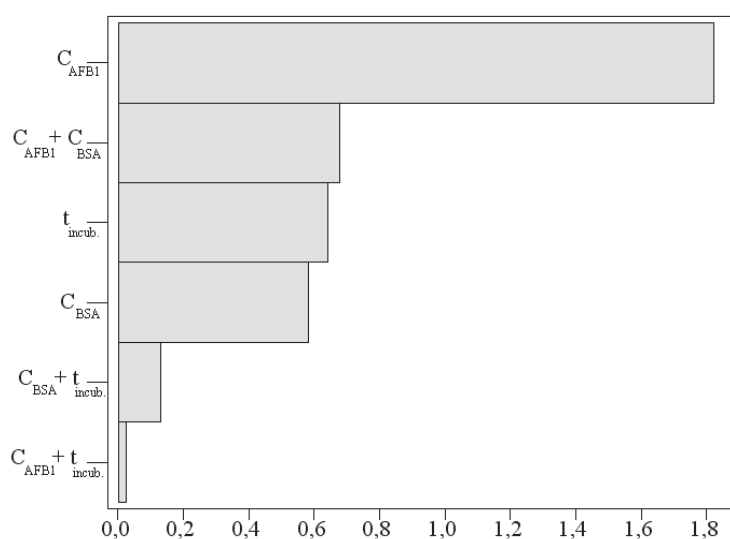
Cabe ressaltar que nesta etapa de experimentos um problema enfrentado foi a repetibilidade dos resultados, provavelmente devido à solução de bloqueio empregada, soroalbumina bovina solubilizada em solução tampão fosfato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4. Por essa razão, foi realizado este mesmo estudo empregando a solução de BSA solubilizada em PBS contendo o detergente Tween 20, que favorece a interação Ac-Ag<sup>65</sup>. As diversas combinações deste planejamento fatorial com os valores de impedância  $R_{ct}$  são apresentadas na Tabela 10.

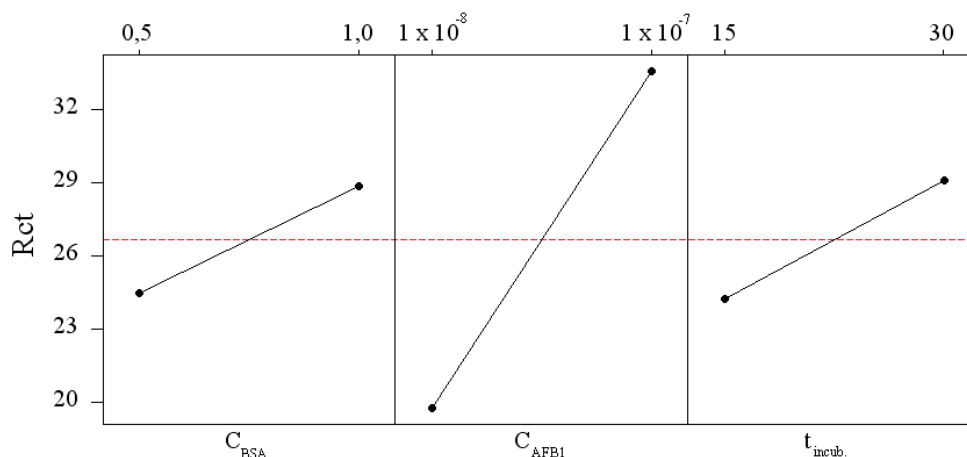
Quando se empregou o Tween na solução de bloqueio observa-se, através do Gráfico de Pareto da Figura 46, que a concentração de  $AFB_1$  foi o fator mais importante no preparo, enquanto o tempo de incubação do antígeno e a concentração de BSA apresentaram menor influência no sistema.

A partir do gráfico de tendências da Figura 47 observou-se que os níveis mais altos apresentaram valor de  $R_{ct}$  maior. Portanto, empregou-se a concentração  $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  para a solução de  $AFB_1$  com tempo de incubação de 30 minutos. Como a concentração de BSA é o fator que menos influência no sistema, adotou-se a concentração de 0,5%, mesmo tendendo a valores de  $R_{ct}$  menores.

**Tabela 10.** Matriz de planejamento fatorial completo  $2^3$  e resistências de transferência de carga.

| Experimento | $C_{BSA} / \%$ | $C_{AFB1} \times 10^{-8} / \text{mol L}^{-1}$ | $t_{\text{incub.}} / \text{min}$ | $R_{ct} / k\Omega$ |
|-------------|----------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1           | 0,5            | 1,0                                           | 15                               | 9,9                |
| 2           | 1,0            | 10                                            | 15                               | 24,9               |
| 3           | 1,0            | 1,0                                           | 30                               | 38,2               |
| 4           | 0,5            | 10                                            | 30                               | 32,4               |
| 5           | 0,5            | 1,0                                           | 15                               | 13,7               |
| 6           | 1,0            | 10                                            | 15                               | 19,7               |
| 7           | 1,0            | 1,0                                           | 30                               | 13,6               |
| 8           | 0,5            | 10                                            | 30                               | 43,1               |
| 9           | 0,5            | 1,0                                           | 15                               | 41,2               |
| 10          | 1,0            | 10                                            | 15                               | 78,2               |
| 11          | 1,0            | 1,0                                           | 30                               | 25,9               |
| 12          | 0,5            | 10                                            | 30                               | 32,8               |
| 13          | 1,0            | 1,0                                           | 15                               | 21,0               |
| 14          | 0,5            | 10                                            | 15                               | 9,0                |
| 15          | 0,5            | 1,0                                           | 30                               | 17,7               |
| 16          | 1,0            | 10                                            | 30                               | 32,1               |
| 17          | 1,0            | 1,0                                           | 15                               | 13,0               |
| 18          | 0,5            | 10                                            | 15                               | 23,4               |
| 19          | 0,5            | 1,0                                           | 30                               | 32,3               |
| 20          | 1,0            | 10                                            | 30                               | 66,2               |
| 21          | 1,0            | 1,0                                           | 15                               | 4,8                |
| 22          | 0,5            | 10                                            | 15                               | 32,2               |
| 23          | 0,5            | 1,0                                           | 30                               | 5,9                |
| 24          | 1,0            | 10                                            | 30                               | 8,7                |

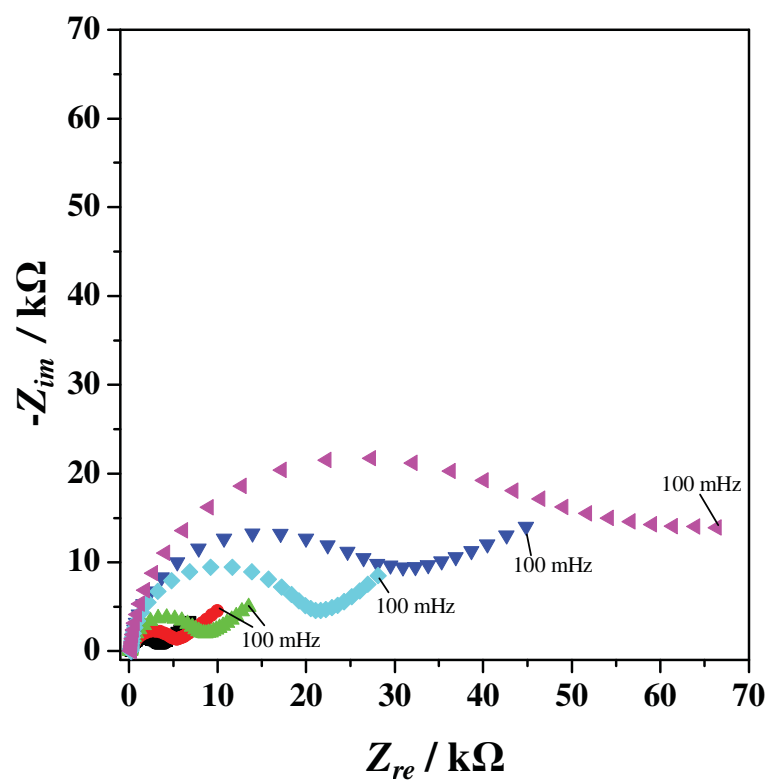
**Figura 46.** Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do antígeno  $AFB_1$  sobre o anticorpo imobilizado sobre a SAM do CDtrodo de ouro.  $C_{BSA}$  = concentração de soroalbumina bovina;  $C_{AFB1}$  = concentração de aflatoxina  $B_1$  e  $t_{\text{incub.}}$  = tempo de incubação da aflatoxina  $B_1$ .



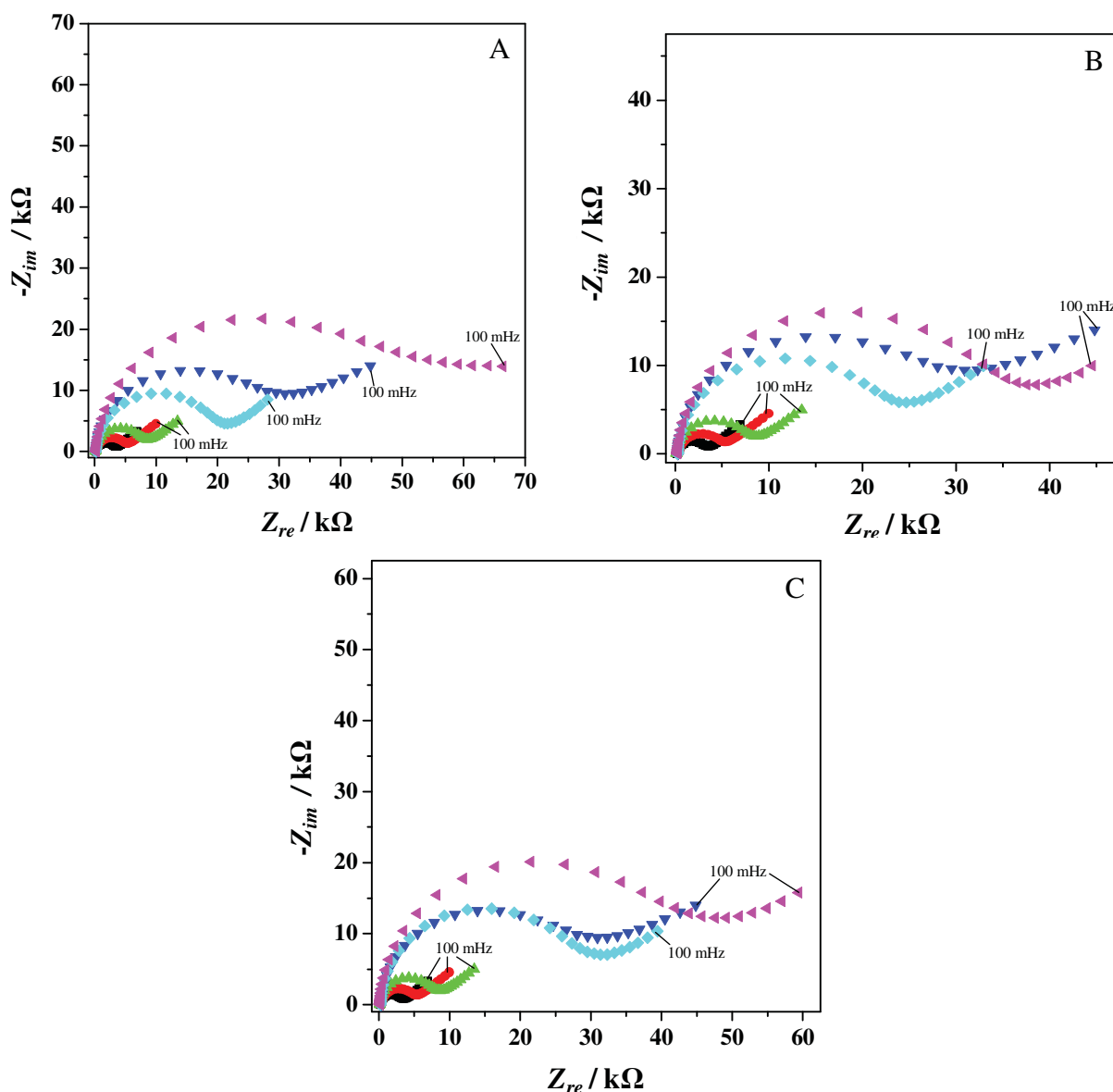
**Figura 47.** Tendência da resistência para os níveis alto e baixo de cada variável.  $C_{BSA}$  = concentração de soroalbumina bovina;  $C_{AFB1}$  = concentração de aflatoxina  $B_1$  e  $t_{incub.}$  = tempo de incubação da aflatoxina  $B_1$ .

A Figura 48 apresenta os diagramas no plano complexo de cada uma das etapas de modificação já otimizada. A cada nova etapa de modificação houve o aumento da impedância em relação à etapa anterior, exceto no bloqueio com a BSA, que apresentou menor impedância do que o CDtrodo com Ac imobilizado sobre a SAM de ácido lipóico ativado com EDC/NHS. Possivelmente os 30 minutos de incubação da BSA não foram suficientes para um adequado bloqueio da superfície do eletrodo de trabalho. Outra possibilidade é a dessorção das moléculas de BSA durante o processo de lavagem do CDtrodo, o que pode levar a formação de espaços livres entre os anticorpos, facilitando a transferência de elétrons.

Então, para verificar o melhor do tempo de incubação da BSA, foram estudados diferentes tempos: 30, 40 e 60 minutos (Figura 49). Observa-se que, com o aumento do tempo de incubação, houve o aumento da impedância do sistema, ou seja, o tempo de 60 minutos apresentou melhor resultado no bloqueio da superfície.



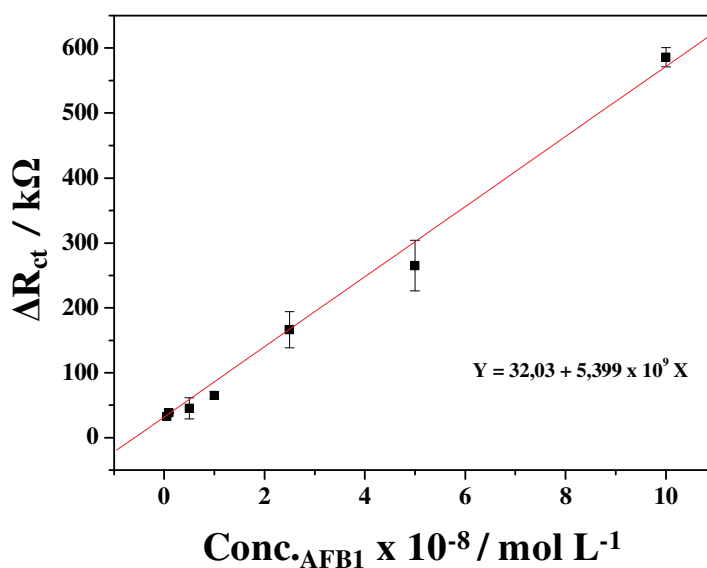
**Figura 48.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 contendo  $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$   $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  para CDtrodo sem modificação (■), CDtrodo modificado com ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (●), grupo carboxílico da SAM ativado com EDC/NHS (▲), anticorpo anti- $\text{AFB}_1$  1:2000 imobilizado sobre a SAM com 1h de incubação (▼), Ac imobilizado e bloqueado com BSA 0,5% com 30 min de incubação (◆) e CDtrodo com  $\text{AFB}_1$   $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  sobre o Ac com 30 min de incubação (▼) vs  $\text{Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$ .



**Figura 49.** Diagrama do plano complexo em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> para CDtrodo sem modificação (■), CDtrodo modificado com ácido lipóico 1 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> (●), grupo carboxílico da SAM com EDC/NHS (▲), anticorpo anti-AFB<sub>1</sub> 1:2000 imobilizado sobre a SAM ativada com 1h de incubação (▼), Ac imobilizado e bloqueado com BSA 0,5% com (A) 30, (B) 40 e (C) 60 min de incubação (◆) e CDtrodo com AFB<sub>1</sub> 1 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> sobre o Ac com 30 minutos de incubação (▼) vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>.

#### 4.14 Curva analítica do imunossensor impedimétrico

Após a otimização de todas as etapas para o desenvolvimento do imunossensor, do ponto de vista impedimétrico, uma curva analítica foi construída como apresentada na Figura 50. Podendo-se observar que a curva apresentou boa região linear no intervalo de  $5 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, obtendo-se coeficiente de relação igual a 0,99419 com limite de detecção e de quantificação igual a  $1,11 \times 10^{-9}$  e  $3,38 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 50.** Curva analítica da concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> do imunossensor impedimétrico.

#### 4.15 Aplicação do imunossensor impedimétrico em amostras de amendoim

O imunossensor impedimétrico foi aplicado em três diferentes amostras de amendoim cru, fornecidas por uma indústria alimentícia que realiza análises de qualidade para verificar a contaminação de seus produtos com aflatoxina. Segundo a indústria fornecedora, duas destas amostras estavam contaminadas com AFB<sub>1</sub> e uma estava com nível de concentração abaixo do limite de estabelecido pela ANVISA (20 µg kg<sup>-1</sup>). No entanto, os níveis da toxina não foram informados.

A Tabela 11 apresenta a concentração de AFB<sub>1</sub> pra cada uma das amostras analisadas por interpolação na curva analítica. Observa-se que as amostras A e B apresentaram níveis aproximadamente 15 vezes superiores ao limite estabelecido pela legislação. Já a amostra C, identificada pela indústria com concentração inferior a 20 µg kg<sup>-1</sup>, apresentou valor 65% superior ao permitido, ou seja, 33 µg kg<sup>-1</sup>. A partir destes resultados, pode-se concluir que o método proposto para a detecção desta micotoxina apresenta-se mais sensível do que o empregado pela indústria, a amostra C apresentou valores superiores ao esperado, devido ao crescimento do fungo *Aspergillus* sp. e consequente produção da aflatoxina durante o transporte e estocagem do produto ou o valor superior seria devido ao efeito de matriz, que poderia ser eliminado aplicando método de adição de padrão.

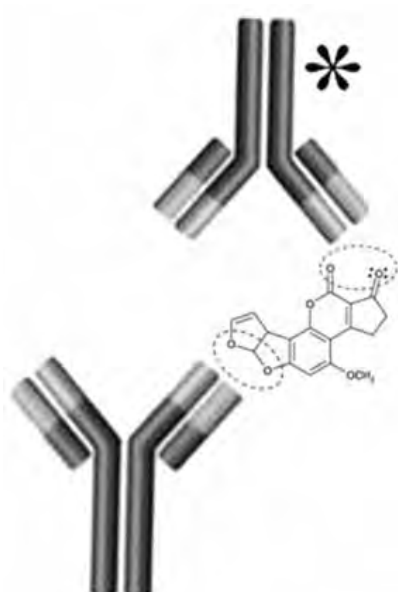
**Tabela 11.** Valores de concentração de AFB<sub>1</sub> encontrados em amostras de amendoim.

| Amostra | Concentração x 10 <sup>-9</sup> / mol L <sup>-1</sup> | Concentração / µg kg <sup>-1</sup> |
|---------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| A       | 9,7 ± 0,5                                             | 301 ± 21                           |
| B       | 9,9 ± 0,7                                             | 309 ± 42                           |
| C       | 1,1 ± 0,3                                             | 33 ± 9                             |

#### 4.16 Estudos preliminares do desenvolvimento do imunossensor amperométrico

Após a otimização das melhores condições para o desenvolvimento do imunossensor impedimétrico, objetiva-se também a construção de um imunossensor amperométrico. Para isso as condições empregadas no imunossensor impedimétrico serão adotadas no amperométrico. No entanto, para o monitoramento da corrente utiliza-se um marcador eletroquímico, o anticorpo anti AFB<sub>1</sub> conjugado com a enzima peroxidase (HPR).

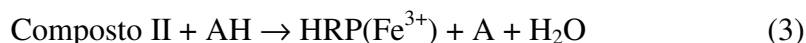
A Figura 51 apresenta o esquema das interações intermoleculares que ocorrem entre o anticorpo primário e o anticorpo secundário com a molécula de aflatoxina B<sub>1</sub>. Esta configuração de interação (Ac-Ag-Ac\*) é conhecida como método sanduiche.



**Figura 51.** Interação do anticorpo e do anticorpo marcado com a molécula de AFB<sub>1</sub>.

A primeira etapa no desenvolvimento do imunossensor amperométrico foi a determinação do melhor potencial a ser aplicado nas medidas de cronoamperometria. Por essa razão, foram realizados experimentos de voltametria de varredura linear para verificar o potencial de redução da reação enzimática mediada pelo 5-ASA.

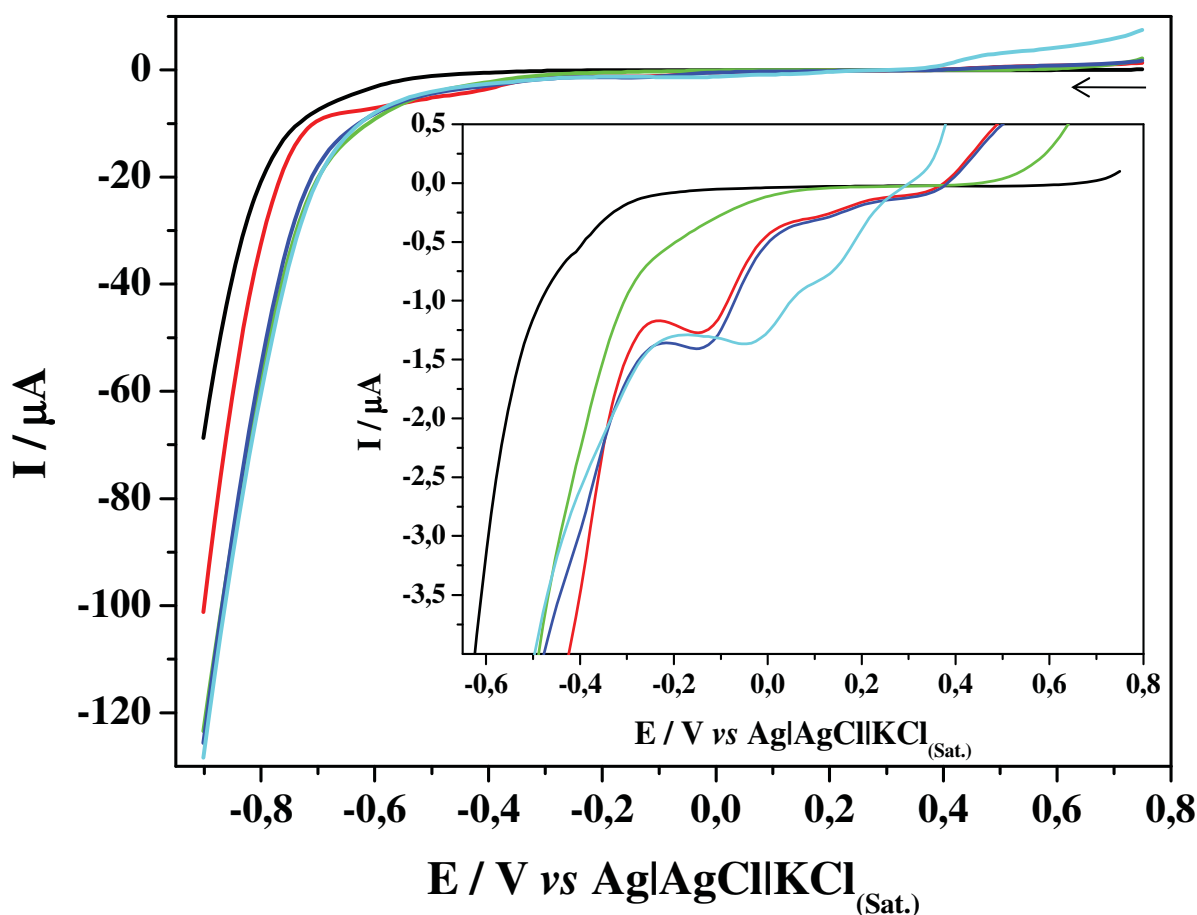
A reação enzimática da peroxidase (HRP) monitorada ocorre em 3 etapas<sup>66</sup>:



A enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, oxidando o grupo heme (1). A enzima oxidada (Composto I) é reduzida ao Composto II (2) que é ainda mais reduzido,

regenerando a enzima (3). Os agentes redutores (AH) como o 5-ASA são capazes de doar elétrons para os compostos I e II. Consequentemente, a redução da espécie A na superfície do eletrodo pode ser empregada para o monitoramento da reação catalisada pela peroxidase.

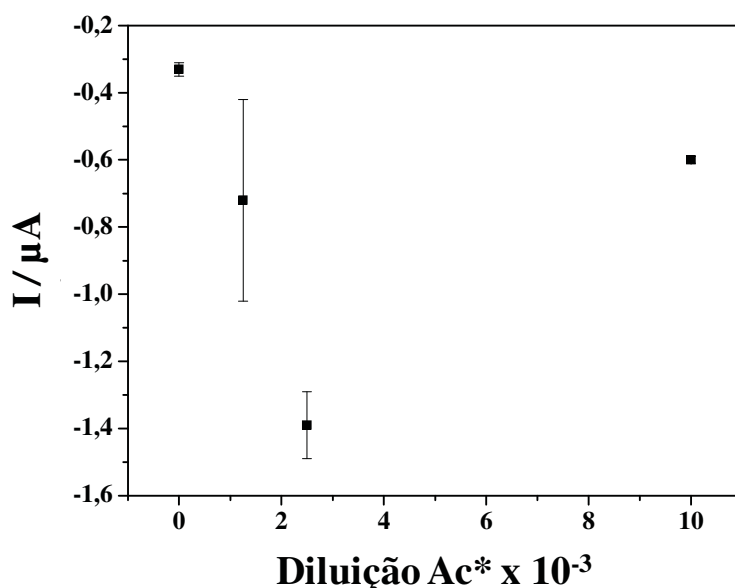
A Figura 52 mostra o comportamento do imunossensor completo e sem o antígeno (branco) em solução tampão citrato-fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0, na presença e ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5-ASA. E observa-se que ocorre uma pequena diferença de corrente entre o imunossensor completo e o branco em aproximadamente -0,150 V. Provavelmente essa diferença foi tão pequena devido à baixa sensibilidade da técnica e pelo eletrodo já ter passado por um grande intervalo de potencial, o que pode ter alterado as modificações na superfície de ouro. Para as etapas subsequentes, foi adotado o potencial de -180 mV.



**Figura 52.** Voltamogramas lineares dos CDtrods modificados com SAM, Ac, BSA, Ag e Ac\* e em solução de tampão citrato-fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0 (—), em solução tampão + 5-ASA (—), em solução tampão + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (—), solução tampão + 5-ASA /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (—) e CDtrods modificados com SAM, Ac, BSA em solução tampão + 5-ASA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (—) vs Ag|AgCl|KCl<sub>(sat)</sub>;  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . Inset: ampliação da região de corrente entre +0,5 e -4,0  $\mu\text{A}$ .

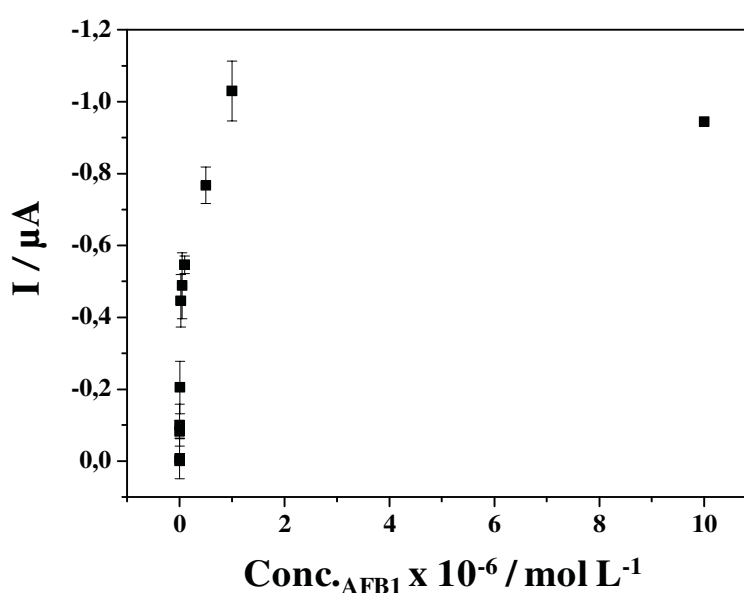
Em seguida, foi analisada a melhor diluição do anticorpo conjugado com HRP. Para isso, empregou-se as diluições de 1:500, 1:2000 e 1:4000 e fixou-se as concentrações do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

e 5-ASA em  $3,5$  e  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente. Observa-se que a região que apresenta menor corrente e que possui a maior variação de corrente em um determinado intervalo de diluição é próximo a 1:2000 (Figura 53). Portanto, nos experimentos seguintes utilizou-se esta diluição do anticorpo anti-ABF<sub>1</sub> conjugado com a peroxidase.



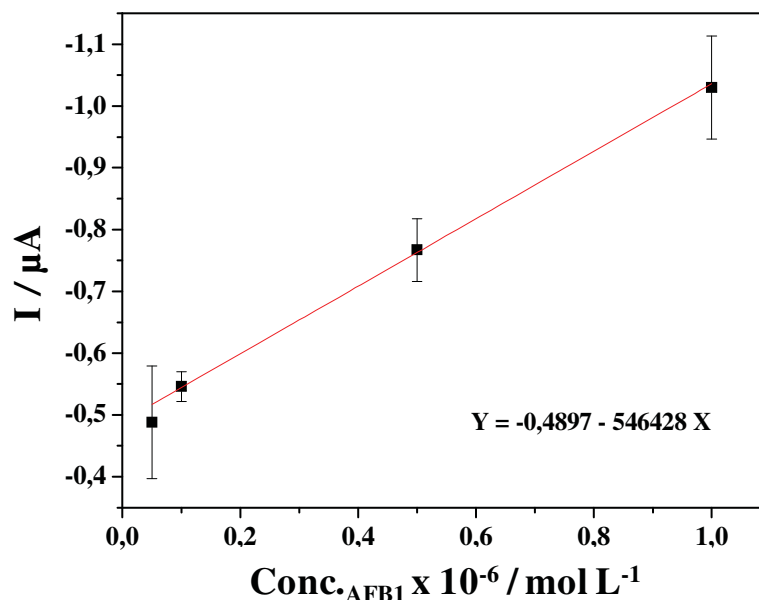
**Figura 53.** Efeito da diluição do anticorpo conjugado com a enzima peroxidase.

Após a definição da melhor diluição do anticorpo secundário, foi construída uma curva analítica do imunossensor amperométrico. Foi utilizada a solução de AFB<sub>1</sub> no intervalo de concentração de  $5 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , mas não foi observado um comportamento linear neste intervalo (Figura 54).



**Figura 54.** Curva analítica da concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> do imunossensor amperométrico para o intervalo de  $5 \times 10^{-10}$  a  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

Selecionou-se, então, o intervalo de  $5 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  da curva analítica da Figura 54, por apresentar boa linearidade, com coeficiente de relação de 0,99597 (Figura 55). No entanto, esta curva foi construída utilizando-se apenas quatro pontos, por essa razão experimentos com novas concentrações dentro deste intervalo linear serão realizados para a obtenção de uma curva analítica mais confiável.



**Figura 55.** Curva analítica da concentração de aflatoxina B<sub>1</sub> do imunossensor amperométrico para o intervalo de  $5 \times 10^{-8}$  a  $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

## 5. CONCLUSÕES

O trabalho envolveu a simplicidade na construção do CDtrodo, porém o entendimento das reações nas diferentes etapas do desenvolvimento dos imunossensores exigiu um grande número de experimentos utilizando técnicas eletroquímicas. Os experimentos compreendem desde a modificação da superfície de ouro (CDtrodo) com SAM, ativação da monocamada, imobilização do Ac (SAM-Ac), bloqueio da superfície com BSA, imunoenaios Ac-Ag e Ac-Ag-Ac\* até o monitoramento da reação enzimática. Técnicas de microscopia foram usadas na caracterização das superfícies modificadas e sem modificações para assegurar os procedimentos realizados. Cabe ressaltar que na otimização da metodologia analítica foi empregado o planejamento fatorial.

A modificação da superfície do CDtrodo de ouro com p-aminotiofenol e proteína A não propiciou a imobilização do anticorpo anti-aflatoxina B<sub>1</sub>. Por essa razão, a formação da monocamada auto-organizada foi realizada com o ácido lipóico  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , tempo de incubação de 2 horas e ativação do grupo carboxílico via EDC/NHS  $0,4 \times 10^{-3}/0,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com incubação de 1 hora a temperatura ambiente.

Os estudos quimiométricos via planejamento fatorial mostraram-se uma boa ferramenta para a otimização das diferentes etapas de modificações. Pois a partir destes estudos pode-se verificar que as melhores condições das seguintes etapas: imobilização do Ac-AFB<sub>1</sub> (diluição de 1:2000 e 1 hora de incubação), bloqueio da superfície com BSA 0,5% e imunorreação com o Ag, com tempos de incubação de 1 hora e 30 minutos, respectivamente.

A partir das imagens de AFM foi possível verificar que existe diferença da camada metálica entre os diferentes tipos de CD de ouro e foi possível observar também, juntamente com as imagens obtidas através da FE-SEM, que a imobilização do anticorpo ocorre tanto nas trilhas de gravação como nas cavidades do CD-R.

O imunossensor impedimétrico mostrou-se eficiente e de baixo custo para a detecção de aflatoxinas B<sub>1</sub> em amostras de amendoim.

## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

1. Investigação de algumas condições no desenvolvimento do imunossensor amperométrico, como a concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e do 5-ASA e o tempo de incubação do eletrodo no eletrólito de suporte contendo substrato e mediador;
2. Aplicação dos imunossensores desenvolvidos em várias outras amostras alimentícias;
3. Comparação do método proposto com outras técnicas, como ELISA e fluorimetria.

## REFERÊNCIAS

- 1 MEIRELLES, P. G.; BIAZON, L.; ONO, M. A.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Semina Ciênc. Agrar.**, v. 27, n. 4, p. 617-628, 2006.
- 2 SULYOK, M.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. **Food Chem.**, v. 119, p. 408-416, 2010.
- 3 KAMIKA, I.; TAKOY, L. L. Natural occurrence of Aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. **Food Control**, 2011. Doi:10.1016/j.foodcont.2011.04.010.
- 4 DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria - potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. **Food Control**, v. 21, p. 370-380, 2010.
- 5 LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 53-75, 2009.
- 6 SCAZZOCCHIO, C. *Aspergillus*: a multifaceted genus. In: SCHAECHTER, M. **Encyclopedia of microbiology**. Oxford: Elsevier, 2009. p. 401-421.
- 7 HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, p. 1677-1692, 2007.
- 8 YE, Y.; ZHOU, Y.; MO, Z.; CHENG, W.; YANG, S.; WANG, X.; CHEN, F. Rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> on membrane by dot-immunogold filtration assay. **Talanta**, v. 81, p. 792-798, 2010.
- 9 CARLSON, M. A.; BARGERON, C. B.; BENSON, R. C.; FRASER, A. B.; PHILLIPS, T. E.; VELKY, J. T.; GROOPMAN, J. D.; STRICKLAND, P. T.; KO, H. W. An automated, handheld biosensor for aflatoxin. **Biosens. Bioelectron.**, v. 14, p. 841-848, 2000.
- 10 RAWAL, S.; KIM, J. E.; COULOMBE, R. A. Jr. Aflatoxin B<sub>1</sub> in poultry: toxicology, metabolism and prevention. **Res. Vet. Sci.**, v. 89, p. 325-331, 2010.
- 11 RAWAL, S.; COULOMBE, R. A. Jr. Metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> in turkey liver microsomes: the relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 2011. Doi:10.1016/j.taap.2011.05.010
- 12 KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **Sábios: Rev. Saúde e Biol.**, v. 2, n. 2, p. 45-54, 2007.
- 13 HUSSAIN, Z.; KHAN, M. Z.; KHA, A.; JAVED, I.; SALEEMI, M. K.; MAHMOOD, S.; ASI, M. R. Residues of aflatoxin B<sub>1</sub> in broiler meat: effect of age and dietary aflatoxin B<sub>1</sub> levels. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 3304-3307, 2010.
- 14 RUSTO, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical method. **Food Chem.**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.
- 15 YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 194-202, 2005.

- 16 FRANCISCATO, C.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M.; WOLKMER, P.; MACIEL, R. M.; PAULA, M. T.; GARMATZ, B. C.; COSTA, M. M. Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 11, p. 1573-1577, 2006.
- 17 GALVEZ, F. C. F.; FRANCISCO, M. L. D. L.; LUSTRE, A. O.; RESURRECCION, A. V. A. **Control of aflatoxin in raw peanuts through proper manual sorting**. Griffin: University of Georgia, 2002. 47 f.
- 18 FACCA, M. C. L.; DALZOTO, P. R. Aflatoxinas: um perfil da situação do amendoim e derivados no cenário brasileiro. **Biológico**, v. 72, n. 1, p.25-29, 2010.
- 19 KHAYOON, W. S.; SAAD, B.; YAN, C. B.; HASHIM, N. H.; ALI, A. S. M.; SALLEH, M. I.; SALLEH, B. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. **Food Chem.**, v. 118, p. 882-886, 2010.
- 20 MEERDINK, G. L. Mycotoxins. **Clin. Tech. Equine Prac.**, v. 1, n. 2, p. 89-93, 2002.
- 21 MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas: análise em amendoim por cromatografia em camada delgada. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Ciências farmacêuticas: toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 194-199.
- 22 NAYAK, S.; SASHIDHAR, R. B. Metabolic intervention of aflatoxin B<sub>1</sub> toxicity by curcumin. **J. Ethnopharm.**, v. 127, p. 641-644, 2010.
- 23 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, 1993. v. 56.
- 24 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Aprova o regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=72&data=22/02/2011>>. Acesso em: 01 jun. 2011.
- 25 STROKA, J.; OTTERDIJK, R. V.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **J. Chromatogr. A.**, v. 904, p. 251-256, 2000.
- 26 KHAYOON, W. S.; SAAD, B.; YAN, C. B.; HASHIM, N. H.; ALI, A. S. M.; SALLEH, M. I.; SALLEH, B. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. **Food Chem.**, v. 118, p. 882-886, 2010.
- 27 PEI, S. C.; ZHANG, Y. Y.; EREMIN, S. A.; LEE, W. J. Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. **Food Control.**, v. 20, p. 1080-1085, 2009.
- 28 WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of recent development of immunosensors. In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications**. Oxford: Elsevier, 2008. Cap. 9, p. 237-260.
- 29 YAMANAKA, H.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; FERREIRA A. A. P. **Biossensores eletroquímicos**. São Paulo: Letra Boreal, 2009. 99 f.

- 30 JIN, X.; JIN, X.; CHEN, L.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for quantification of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Biosens. Bioelectron.**, v. 24, p. 2580-2585, 2009.
- 31 VIG, A.; RADOI, A.; MUÑOZ-BERBEL, X.; GYEMANT, G.; MARTY, J. Impedimetric aflatoxin M<sub>1</sub> immunosensor based on colloidal gold and silver electrodeposition. **Sens. and Actuators , B**, v. 138, p. 214-220, 2009.
- 32 PARKER, C. O.; TOTHILL, I. E. Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxina M<sub>1</sub> in milk with focus on matrix interference. **Biosens. Bioelectron.**, v. 24, p. 2452-2457, 2009.
- 33 ANSARI, A. A.; KAUSHIK, A.; SOLANKI, P. R.; MALHOTRA, B. D. Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 75-81, 2010.
- 34 SHERIFF, S. Antibody-antigen complex, three dimensional structures. In: DELVES, P. J. **Encyclopedia of immunology**. 2nd ed. Oxford: Elsevier, 1998. p. 159-163.
- 35 SURI, C. R.; JAIN, P. K.; MISHRA, G. C. Development of piezoelectric crystal based microgravimetric immunoassay for determination of insulin concentration. **J. Biotechnol.**, v. 39, p. 27-34, 1995.
- 36 MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Bean sprout peroxidase biosensor based on l-cysteine self-assembled monolayer for the determination of dopamine. **Sens. and Actuators, B**, v. 133, p. 364-369, 2008.
- 37 LEE, W.; OH, B.; BAE, Y. M.; PAEK, S.; LEE, W. H.; CHOI, J. Fabrication of self-assembled protein A monolayer and its application as an immunosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v. 19, p. 185-192, 2003.
- 38 LEE, W.; LEE, D.; OH, B.; LEE, W. H.; CHOI, J. Nanoscale fabrication of protein A on self-assembled monolayer and its application to surface plasmon resonance immunosensor. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 35, p. 678-682, 2004.
- 39 ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosens. Bioelectron.**, v. 24, p. 2810-2817, 2009.
- 40 ASAV, E.; AKYILMAZ, E. Preparation and optimization of a bienzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. **Biosens. Bioelectron.**, v. 25, p. 1014-1018, 2010.
- 41 MENDES, R. K.; CARVALHAL, R. F.; KUBOTA, L. T. Effects of different self-assembled monolayer on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. **J. Electroanal. Chem.**, v. 612, p. 164-172, 2008.
- 42 GODÍNEZ, L. A. Substratos modificados con monocapas autoensambladas: dispositivos para fabricar sensores y estudiar procesos químicos y fisicoquímicos interfaciale. **J. Mexican Chem. Soc.**, v. 43, p. 219-229, 1999.
- 43 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 1533-1554, 1996.

- 44 GANESH, V.; PANDEY, R. R.; MALHOTRA, B. D.; LAKSHMINARAYANAN, V. Electrochemical characterization of self-assembled monolayers (SAMs) of thiophenol and aminothiophenols on polycrystalline Au: effects of potential cycling and mixed SAM formation. **J. Electroanal. Chem.**, v. 619-620, p. 87-97, 2008.
- 45 CHOW, E.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. Electrochemical detection of lead ions via the covalent attachment of human angiotensin I to mercaptopropionic acid and thioctic acid self-assembled monolayers. **Anal. Chim. Acta**, v. 543, n. 1-2, p. 167-176, 2005.
- 46 ANGNES, L.; RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H. Gold electrodes from recordable CDs. **Anal. Chem.**, v. 72, p. 5503-5506, 2000.
- 47 FOGUEL, M. V.; ULIANA, C. V.; TOMAZ, P. R. U.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. A. P. Avaliação da limpeza de CDtrodo construídos a partir de CD de ouro gravável/fita adesiva de galvanoplastia. **Ecl. Quím.**, v. 34, n. 2, p. 59-66 2009.
- 48 RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H.; MIOSHI, R. N.; ANGNES, L. Gold electrodes from recordable CDs for mercury quantification by flow injection analysis. **Fresen. J. Anal. Chem.**, v. 366, p. 444-448, 2000.
- 49 LOWINSOHN, D.; RICHTER, M. A.; ANGNES, L.; BERTOTTI, M. Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner masks. **Electroanalysis**, v. 18, n. 1, p. 89-94, 2006.
- 50 CHRISTENSEN, P. A.; HAMNETT, A. **Techniques and mechabisms in electrochemistry**. London: Alden Press, 1994.
- 51 DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Quím. Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
- 52 DENUAULT, G.; SOSNA, M.; WILLIAMS, K. Classical experiments. In: ZOSKI, C. G. **Handbook of electrochemistry**. Oxford: Elsevier, 2007. Cap. 11, p. 431-470.
- 53 ALLEN, T.; RUTHERFORD, S.; MURRAY, S.; REIPERT, S.; GOLDBERG, M. Field emission scanning electron microscopy and visualization of the cell interior. In: CELIS, J. E. **Cell biology**. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2006. v. 3, cap. 33, p. 325-333.
- 54 FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.
- 55 FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. **Biosens. Bioelectron.**, v. 21, n. 1, p. 175-181, 2005.
- 56 ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of Hepatitis C virus using fractional factorial designs. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, p. 782-787, 2008.
- 57 RICCARDI, C. S.; DALMOUCHE, K.; SANTILLI, C. V.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. DNA amperometric biosensor for the diagnosis of hepatitis C virus. **Talanta**, v. 70, p. 637-643, 2006.
- 58 SIDNEY, P. C. W.; NATHAN, O. K. **Methods in enzimology**. New York: Academic Press, 1955. v. 1.

- 59 ULIANA, C. V. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para a detecção do vírus da hepatite C**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- 60 HNAIEN, M.; DIOUANI, M. F.; HELALI, S.; HAFAID, I.; HASSEN, W. M.; RENAULT, N. J.; GHRAM, A.; ABDELGHANI, A. Immobilization of specific antibody on SAM functionalized gold electrode for rabies virus detection by electrochemical impedance spectroscopy. **Biochem. Eng. J.**, v. 39, p. 443-449, 2008.
- 61 CUNNIFF, P. (Ed.). **Association of official analytical chemists**. 16th ed. Washington, DC: AOAC, 1999. v. 2, p. 2-28.
- 62 PERDRIEL, C. L.; ARVIA, A. J.; IPOHORSKI, M. Electrochemical faceting of polycrystalline gold in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. **J. Electroanal. Chem.**, v. 215, p. 317-329, 1986.
- 63 HERMANDON, G. T. Zero-length cross-linkers. In:\_\_\_\_\_. **Bioconjugate techniques**. San Diego: Academic Press, 1996. Cap. 3, p. 169-173.
- 64 BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. Impedance methods. In:\_\_\_\_\_. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1994. Cap. 11, p. 224-252.
- 65 CROWTHER, J. R. **ELISA: theory and practice**. New Jersey: Humana Press, 1995. 218 p.
- 66 FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. **Biosens. Bioelectron.**, v. 21, p. 175-181, 2005.