

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 14/03/2025.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

Instituto de Química - Araraquara

TESE DE DOUTORADO

**Imunossensor impedimétrico para detecção de
Candidatus Liberibacter Asiaticus em citros.**

LUCAS MOREIRA SILVA

**Araraquara
2023**

Lucas Moreira Silva

Imunossensor impedimétrico para detecção de *Candidatus Liberibacter Asiaticus* em citros.

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka

**Araraquara-SP
2023**

S586i Silva, Lucas Moreira
Imunossensor impedimétrico para detecção de
Candidatus Liberibacter Asiaticus em citros / Lucas
Moreira Silva. -- Araraquara, 2023
181 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Hideko Yamanaka

1. Laranja - Doenças e pragas. 2. Biossensores. 3.
Diagnóstico. 4. Espectroscopia de impedância. 5.
Nanopartículas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Imunossensor impedimétrico para detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em citros"

AUTOR: LUCAS MOREIRA SILVA

ORIENTADORA: HIDEKO YAMANAKA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HIDEKO YAMANAKA (Participação Presencial)

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ASSIS VICENTE BENEDETTI (Participação Presencial)

Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. NELSON ARNO WULFF (Participação Presencial)

Departamento Científico, Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento / Fundo de Defesa da Citricultura - FUNDECITRUS - Araraquara

Prof.ª Dr.ª DJENAINÉ DE SOUZA (Participação Presencial)

Instituto de Química - UFU - Patos de Minas

Dr. MURILO SANTHIAGO (Participação Virtual)

Laboratório Nacional de Nanotecnologia - LNNano - Campinas

Araraquara, 14 de março de 2023

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Moreira Silva

Nascimento: 03/10/1993

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Carmo do Paranaíba/MG - Brasil

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Monir Reis Moreira e Selma Luiza da Silva Moreira

E-mail: lucassilvamg0@gmail.com ou luca.m.silva@unesp.br

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55 Bairro: Quitandinha. CEP: 14800-060 Araraquara/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Doutorado em Biotecnologia (andamento)

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP.

Período: 09/2018 – 03/2023

Título da tese: Imunossensor impedimétrico para detecção de *Candidatus Liberibacter Asiaticus* em citros.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka

Bolsa: CAPES

Mestrado em Biotecnologia

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP.

Período: 08/2016 – 09/2018

Título da dissertação: Síntese e caracterização de MIP-magnético para desenvolvimento de sensor eletroquímico para determinação de ciprofloxacina em amostras complexas para aplicação biotecnológica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Coorientador: Dr. Marcos Vinicius Foguel

Bolsa: CAPES

Graduação em Biotecnologia

UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Campus de Patos de Minas, Patos de Minas/MG

Período: 08/2011 – 08/2016

Título do trabalho de conclusão de curso: Ziram herbicide determination using a polished silver solid amalgam electrode.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Djenaine de Souza

Publicações

SILVA, LUCAS M.; FOGUEL, MARCOS V.; SOTOMAYOR, MARIA DEL PILAR T. Use of two functional monomers for a new approach to the synthesis of a magnetic molecularly imprinted polymer for ciprofloxacin. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 15, p. 511-523, 2022. Doi: 10.1016/j.jmrt.2021.08.023.

SILVA, CAIO CÉSAR GONÇALVES; SILVA, LUCAS MOREIRA; E SILVA, BEATRIZ COSTA; GARRIDO, SAULO SANTESSO; BOLDRIN, MARIA VALNICE ; DE SOUZA, DJENAINÉ. Cathodic stripping voltammetric determination of β -cyfluthrin, a pyrethroid insecticide, using polished silver solid amalgam electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, p. 1-8, 2020. Doi: 10.1007/s10008-020-04538-w.

SILVA, L. M.; DE SOUZA, D. Ziram herbicide determination using a polished silver solid amalgam electrode. **Electrochimica Acta**, v. 224, p. 541-550, 2016. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.11.133

Artigos submetidos

Lucas Moreira Silva; Antonio Ap. Pupim Ferreira; Hideko Yamanaka. Diseases affecting citrus: characteristics and diagnostic approaches. **Biotechnology Advances**. Submetido em 30/01/2023.

Lilian D. Moura Torquato; Lucas Moreira Silva; Beatriz Costa E Silva; Caroline V. Rodrigues; Daiana Camila Da Silva; Sandra I. Maintinguer; Maria Valnice Boldrin Zanoni. The role of surface properties of bagasse biochars in electron transfer mediation during the bioconversion of glycerol into H₂ and high added-value products. **Bioresource Technology**. Submetido em 05/02/2023.

Capítulo de livro

Hideko Yamanaka; Lucas Moreira Silva. Métodos potenciométricos. Cap. 2; p. 31-56. In: Métodos eletroanalíticos: conceitos, experimentos e aplicações. Organizado por Nelson Ramos Stradiotto [et al.]. – São Paulo: Cultura Acadêmica, 2021. ISBN: 978-65-5954-175-1

SILVA, L. M.; FOGUEL, M. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Ciprofloxacin: analytical methods for its monitoring in the environment. In: Ciprofloxacin: biosynthesis, applications, and adverse effects. Nova science publishers, 2018.

Produção tecnológica

Depósito de pedido de Patente intitulado 22CI025 - IMUNOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO HUANGLONGBING (HLB) de autoria de Lucas Moreira Silva; Antonio Aparecido Pupim Ferreira; Hideko Yamanaka. Agência UNESP de Inovação AUIN, 2022.

Participação em eventos científicos

Apresentação de trabalho System for butylparaben analysis de autoria de Maria Letícia Mendes Soares, Lucas Moreira Silva, Carolina Venturini Uliana, Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes e Hideko Yamanaka foi apresentado na forma de Poster durante o XX Encontro Nacional de Química Analítica/XII Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, realizado em Bento Gonçalves, RS, de 25 a 28 de setembro de 2022.

Apresentação de trabalho Study of the photoelectroreduction of Ti/TiO₂ nanotubes modified by UIO-Zr-NH₂ metal-organic framework de autoria de Kallyni Irikura, Lucas Moreira Silva, Regina Frem, Maria Valnice Zanoni foi apresentado na forma de Oral durante o XX Encontro Nacional de Química Analítica/XII Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, realizado em Bento Gonçalves, RS, de 25 a 28 de setembro de 2022.

Apresentação de trabalho Dispositivo para extração e degradação de corantes em efluentes de salões de cabeleireiros por fotocatalise autoria de Giovanna de Deus Sperandio, Kallyni Irikura, Lucas Moreira Silva, João Carlos de Souza, Maria Valnice Boldrin Zanoni, foi apresentado na forma de Poster durante o 1ª fase do XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado em Araraquara por meio da plataforma Even3,, SP, de 28 a 29 de outubro de 2021.

Apresentação de trabalho Otimização de sistema microfluídico para análise eletroquímica do butilparabeno de autoria de Maria Letícia Mendes Soares, Lucas Moreira Silva, Carolina Venturini Uliana, Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes e Hideko Yamanaka, foi apresentado na forma de Pôster durante o 1ª fase do XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado em Araraquara por meio da plataforma Even3, SP, de 28 a 29 de outubro de 2021.

Apresentação de trabalho Comportamento eletroquímico de butilparabeno empregando dispositivo 3D de autoria de Maria Letícia Mendes Soares, Lucas Moreira Silva, Carolina Venturini Uliana, Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes e Hideko Yamanaka, foi apresentado

na forma de Pôster durante o 1ª fase do XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, realizado em Araraquara, SP, de 20 a 22 de outubro de 2020.

Apresentação de trabalho Amperometric immunosensor for aflatoxin B1 de autoria de Lucas Moreira Silva, Carolina Venturini Uliana, Jaime Ricardo Vega Chacon, Miguel Miguel e Hideko Yamanaka foi apresentado na forma de Oral durante o XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, realizado em Ribeirão Preto, SP, de 01 a 05 de setembro de 2019. Ribeirão Preto, setembro de 2019.

Apresentação de trabalho Electrochemical sensor for β -cyfluthrin, a pyrethroid insecticide, in citrus sample by cathodic stripping voltammetry at p-AgSAE electrode de autoria de Caio César Gonçalves Silva, Lucas Moreira Silva, Maria Valnice Zanoni e Djenaine De Souza foi apresentado na forma de Oral durante o XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, realizado em Ribeirão Preto, SP, de 01 a 05 de setembro de 2019.

Atividades didáticas

Realização de estágio supervisionado à docência na disciplina Análise Instrumental Quantitativa – Teórica/Prática para o curso de bacharelado em Farmácia sob supervisão da Profa. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira em 2022/02.

Realização de tutoria na disciplina Análise Instrumental Quantitativa – Teórica/Prática para o curso de bacharelado em Farmácia sob supervisão da Profa. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira e Profa Dra. Hideko Yamanaka em 2021/02.

Realização de estágio supervisionado à docência na disciplina Química Analítica Qualitativa - Prática para o curso de bacharelado em Engenharia Química sob supervisão da Profa. Dra. Mirian Cristina dos Santos em 2021/01.

Realização de estágio docência na disciplina de Bioquímica Geral e Experimental II – Turma teórica para o curso de bacharelado em química sob supervisão da Profa. Dra. Denise Bevilaqua em 2021/01.

Participação em banca

Participação em banca de Fernanda Cristina de Oliveira Lopes Martins. “Dental amalgam electrode as voltammetric detection of triazine-based: application in natural water samples. 2019”. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Uberlândia desenvolvido sob orientação da Profa. Dra. Djenaine De Souza.

Outras atividades

Participação como membro de comissão organizadora de evento de extensão: IQ de Portas Abertas, ocorrido no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, no dia 18 de novembro de 2022.

Participação como membro de comissão organizadora de evento de extensão: Pint of Science Brasil, ocorrido na Cervejaria Avenida 42 em Araraquara, no período de 07 a 09 de novembro de 2022.

Participação como membro de comissão organizadora de evento de extensão: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, ocorrido no Shopping Lupo 42 em Araraquara, no período 18 a 20 de outubro de 2018.

*Dedico este trabalho a Deus
pelo dom da vida, aos meus
pais Monir e Selma, pelo
amor e apoio na minha vida.*

*“É de sonho e de pó
O destino de um só
Feito eu perdido
Em pensamentos
Sobre o meu cavalo
É de laço e de nó
De jibeira o jiló
Dessa vida
Cumprida a sol”
(Romária - Renato Teixeira)*

*“O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquentada e esfria,
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”
(Grande Sertão Veredas - João Guimarães Rosa)*

*“O sucesso consiste em ir de derrota em derrota sem perder o entusiasmo.”
(Winston Churchill)*

*E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
(Caminhos do Coração - Elba Ramalho)*

*Eu sou apenas um rapaz latino-americano
Sem dinheiro no banco sem parentes importantes
E vindo do interior
(Apenas um Rapaz Latino Americano - Belchior)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade e misericórdia para com minha vida, dando-me força nos momentos difíceis, coragem e sabedoria. A Ele toda honra e toda glória, pois todas as conquistas e vitórias alcançadas em minha de vida é para glorificar seu nome.

Aos meus pais, Monir e Selma, e ao meu irmão Mateus, por sempre apoiarem meus caminhos e incentivar a minha formação.

Às minhas avós Andrezina e Helena (in memória), por sempre me colocar em suas orações. Vó Lena, a senhora sempre me dizia: “A única coisa que não podem te tirar são os estudos!”.

À minha família, pelo apoio, e por entender os momentos que eu não pude estar com vocês.

À Prof.^a Dr.^a Hideko Yamanaka, pela orientação enriquecedora, pela confiança depositada, o apoio nos momentos difíceis, pela compreensão, pelo o incentivo, pela amizade e pelos ensinamentos tão essenciais ao desenvolvimento deste trabalho e construção da minha carreira. A senhora me ensinou não só ser um profissional, mas também, a ser um ser humano. Sou extremamente grato!

Ao Dr. António Aparecido Pupim Ferreira, pela orientação, confiança, paciência, ensinamento, amizade, incentivo, conselhos, ensinamentos e discussões sempre pertinentes e instigantes, que levaram a execução deste trabalho.

Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti e ao Dr. Nelson Arno Wulff pela avaliação e contribuições científicas para o desenvolvimento deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

Às Prof.^{as}. Dr.^{as}. Denise Bevilaqua; Raquel Fernandes Pupo Nogueira; Mirian Cristina Dos Santos e Fabíola Manhães Verbi Pereira, pela supervisão nas distintas atividades à docência que pude experimentar durante o período deste doutorado. Vocês contribuíram de forma muito significativas em minha formação!

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido por ter cedido de forma solícita o uso do liofilizador para etapas de avaliação de estabilidade do material.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), pela colaboração técnico-científica e por ceder sua estrutura física e operacional.

A Me. Elaine Cristina Martins, pela colaboração na execução deste trabalho, por colaborar no preparo de todas as amostras de extratos vegetais utilizadas, análise utilizando técnica de qPCR neste trabalho, pelas contribuições científicas sempre pertinentes em nossas reuniões. Obrigado por me receber de tão bem todas as vezes que fui ao Fundecitrus.

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota pela oportunidade, atenção e profissionalismo prestado durante meu estágio no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores - LEEDS, na UNICAMP em Campinas. A todos os integrantes do grupo, Rúbia, João Paulo, Patrícia, Thaís Rabelo, Neuryelen, Rafael, Dahwin e Regina e Taís Xastre. Obrigado pela amizade construída, pelas discussões científicas sempre pertinentes e instigantes, por todos os momentos de descontração, pelos cafés, almoços no RA (porque lá é servido no prato e não bandeja, rs), pelo suporte nos momentos de estresse e desânimo, e por toda a parceria que tornaram esses meses que estive com vocês inesquecíveis. Aos amigos de fora do laboratório, Tatiana, Samuel e Luiz, obrigado pelo apoio, por todos os momentos de descontração, amizade construída. Obrigado por também fazerem que meus dias em Campinas tenham sido tão bons!

Prof. Dr. William Reis de Araujo por ter cedido de forma solícita o uso da impressora de corte a laser de CO₂ a seu aluno de doutorado Me. Lucas Felipe de Lima pelas orientações no uso no equipamento.

Aos meus amigos da UNESP, Caio, Kallyni, Saídy, Hernan, Thaís, Karen, Weida, João Pedro, Lillian, João Perine, Bárbara, Carolina Zambom, Nayara Melo. Obrigado pela amizade construída, por todos os cafés e os momentos de descontração, pelo suporte nos momentos de estresse e desânimo, e por toda a parceria que tornaram esses anos inesquecíveis!

A Maria Leticia, minha primeira aluna de IC, obrigado pelo apoio e companheirismo. Meu papel era ensinar a você, mas você não tem noção do quanto me ensinou. Além disso, me mostrou que estou certo em seguir nessa carreira acadêmica!

A todos os colegas do GEAr pelas discussões científicas e momentos de descontração durante os cafés.

Ao Rev. Luiz Mello, pelo acolhimento, pelas conversas e orientações, pelos momentos de descontração, você foi instrumento da benção de Deus em minha vida. Estendo os meus agradecimentos a todos da Igreja Presbiteriana Boas Novas, vocês foram instrumentos de Deus em minha vida!

A Kezia e ao Gustavo, por terem me acolhido como um irmão/filho em sua casa e em suas vidas. Pelo apoio e a amizade construída de forma

tão orgânica, pois sei que posso contar com vocês sempre. Seja para compartilhar felicidades, uma piada, uma risada ou para dividir uma tristeza, uma lágrima. Por meio de vocês eu pude ver um pouco do Reino aqui! Vocês são benção de Deus em minha vida!

A Débora e ao Octavio, por sempre me receberem tão bem em sua casa e deixar que eu faça parte de suas vidas. Pela amizade construída de forma tão leve. Pelo apoio em horas difíceis, pelos nossos almoços e tardes na piscina, nossos jantares e conversas que iam até a madrugada. Vocês são benção de Deus na minha vida e são muito especiais em minha caminhada! Sei que posso contar com vocês sempre!

A Prof^a. Dr^a Djenaine de Souza, minha orientadora de IC que se tornou uma amiga. Muito obrigado por todo o apoio profissional e pessoal! Obrigado pelos ensinamentos e discussões científicas sempre pertinentes e instigantes, pelos conselhos de vida, pelo apoio nas horas difíceis, e pelas alegrias compartilhadas, por todos os momentos de descontração sempre acompanhadas de um bom café ou um bom vinho. Agora nos tornamos além de amigos colegas de profissão!

A Maraíza, pela amizade de longo tempo, e hoje de longa distância também. Obrigado por sempre me receber de forma tão generosa e acolhedora em sua casa, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis, por entender os momentos que eu não pude estar próximo e mostrar que a amizade não se altera com a distância e o tempo!

Ao meu trio de crossfit Marina e Maria Eduarda, pelos treinos em equipe, pelo apoio e nossas brincadeiras no dia a dia! Meus dias ficam mais leves quando treinamos em conjunto. A todos os colegas de esporte do Box 036. Muito obrigado por fazerem parte desta caminhada, pelos treinos em conjunto e momentos de descontração.

Ao meu amigo Estevão Áquila, pelo apoio, incentivo e a amizade construída de forma tão natural. Você sabe o valor desta conquista meu amigo! Sei que posso contar com você sempre! Seja para compartilhar conquistas, uma piada, um café da tarde, um almoço, uma risada ou para dividir uma tristeza, uma lágrima. Por meio de você eu pude ver como Deus coloca pessoas certas nos momentos certos!

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 infraestrutura e acolhida durante esses anos.

Ao Instituto Nacional de Tecnologias Alternativas para Detecção, Avaliação Toxicológica e Remoção de Contaminantes Emergentes e Radioativos (INCT-DATREM); Proc. CNPq 465571/2014-0 e Proc. FAPESP 2014/50945-4.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001.

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

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!”

Romanos 11:36

RESUMO

A citricultura é um dos setores mais bem organizados da agroindústria brasileira, dispondo de fundações empresariais de assessoria e monitoramento da produção e da qualidade dos citros. Atualmente a produção brasileira está concentrada no denominado de cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais, região geográfica que engloba 481 municípios e 12 mil fazendas, totalizando uma área plantada de mais de 400 mil hectares, sendo responsável por 60% da produção mundial de suco de laranja. Entretanto, a citricultura vem enfrentando alguns desafios em função da disseminação de diferentes doenças, das quais podemos ressaltar o Huanglongbing (HLB) também nomeada “*greening*”, que é provocada pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* as quais são transmitidas para as plantas pelo psíldeo *Diaphorina citri*. A detecção de plantas contaminadas com “*greening*” no pomar ocorre de forma visual e geralmente subjetiva e os métodos laboratoriais existentes demandam tempo de análise e elevado custo financeiro. Desta maneira, no presente trabalho desenvolveu-se um imunossensor impedimétrico seletivo para a detecção e determinação de HLB em amostras de citros. O anticorpo anti-HLB, obtido comercialmente a partir da proteína de membrana externa (OMP), foi imobilizado sobre nanopartícula magnética previamente sintetizada e caracterizada. O anticorpo devidamente imobilizado foi colocado em contato com as diferentes amostras de extratos de folhas de plantas cítricas, após a reação de afinidade com o antígeno realizou-se a etapa de lavagem do material para minimizar o efeito de matriz. O monitoramento da reação de afinidade foi efetuado por espectroscopia de impedância eletroquímica, empregando como eletrodo de trabalho o carbono vítreo contendo em seu interior um ímã de neodímio. O dispositivo desenvolvido distingue as amostras positivas ao HLB das amostras negativas ao HLB e das positivas ao CTV. Os resultados obtidos pelo imunossensor impedimétrico corroboraram os dados alcançados pela técnica equivalente a técnica “padrão ouro” qPCR.

Palavras chaves: Citricultura; Greening, Huanglongbing (HLB); Diagnóstico; Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE); Imunossensor eletroquímico; Biossensor; Nanopartículas magnéticas.

ABSTRACT

Citrus farming is one of the best-organized sectors of the Brazilian agroindustry, with business foundations for advising and monitoring citrus production and quality. Currently the Brazilian production is concentrated in the so-called citrus belt of São Paulo and Minas Gerais, a geographic region that encompasses 481 municipalities and 12,000 farms, totaling a planted area of over 400,000 hectares, accounting for 60% of world production of orange juice. However, citrus farming has been facing a decline in productivity and quality of the fruits generated due to the spread of different diseases, of which we can highlight Huanglongbing (HLB) also known as “greening”, which is caused by the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Candidatus Liberibacter americanus*, which are transmitted to plants by the psyllid *Diaphorina citri*. The detection of plants contaminated with “greening” in the crop occurs visually and is generally subjective, and existing laboratory methods demand analysis time and high financial cost. Thus, the present work developed a selective impedimetric immunosensor for the detection and determination of HLB in citrus samples. The anti-HLB antibody, obtained commercially from the outer membrane protein (OMP), was immobilized on a previously synthesized and characterized magnetic nanoparticle. The immobilized antibody was placed in contact with different samples of extracts of citrus plant leaves, after the affinity reaction with the antigen, material was washed to minimize the matrix effect. The monitoring of the affinity reaction was carried out by electrochemical impedance spectroscopy, using glassy carbon containing the neodymium magnet as the working electrode. The developed device distinguishes HLB-positive samples from HLB-negative samples and CTV-positive ones. The results obtained by the impedimetric immunosensor corroborated the data obtained by the technique equivalent to the “gold standard” technique qPCR.

Keywords: Citriculture; Huanglongbing (HLB); Diagnosis; Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS); Electrochemical immunosensor; Biosensor; Magnetic nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rota de dispersão de citros pelo mundo. 1) Indochina, 2) Oriente Médio; 3) Norte da África, 4) Península Ibérica, 5) Caribe e 6) Brasil.	2
Figura 2: Classificação dos produtores de laranja do mundo em milhões de toneladas.	5
Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura em vasos do floema de citros com <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> e b) psílídeo <i>Diaphorina citri</i>	9
Figura 4: Sintomas típicos do HLB. Em a) ramos e em b) frutos.	10
Figura 5: Ciclos térmicos realizados por PCR.	12
Figura 6: Representação de molécula de imunoglobulina IgG.	15
Figura 7: Tipos de ELISA. a) direto; b) indireto; c) sanduíche e d) competitivo	16
Figura 8: Número de publicações exibidas em uma pesquisa no site Science Direct. Palavras-chave empregadas: "citrus diseases diagnostic PCR", "citrus diseases diagnostic ELISA" e "citrus diseases diagnostic electrochemical biosensors".	18
Figura 9: Representação geral de biossensores.	19
Figura 10: Mecanismo de formação de partículas em solução. Curva a) nucleação simples e crescimento uniforme por difusão explicado pelo modelo de LaMer e Dinegar; Curva b) nucleação, crescimento e agregação de subunidades e Curva c) evento de nucleação múltipla e amadurecimento de Ostwald.	24
Figura 11: Esquema da modificação da superfície de mNPs com sílica empregando um alcóxissilano.	27
Figura 12: Representação esquemática dos fasores E e I.	32
Figura 13: Curvas e esquemas característicos da impedância eletroquímica. Em (a) Diagrama de Nyquist ou plano complexo e em (b) Diagrama de Bode.	34
Figura 14: Modelos de DCE. Em a) modelo descrito por Helmholtz e em b) modelo descrito por Grahame.	37
Figura 15: Representação de síntese de mNP em modificação com APTES, formado mNP A.	44
Figura 16: Preparação dos extratos de folhas de plantas cítricas; a) coleta e identificação de material; b) higienização das folhas coletadas; c) extração de pecíolo; d-e) processamento da amostra e f) transferência para tubo.	53
Figura 17: Imagens de folhas de plantas de laranja (<i>Citrus sinensis</i>) com diferentes características. Em a) folha sadia; em b) nervura central amarela; em c) manchas verdes e amarelas; em d) deficiência de nutrientes e em e) mosqueado.	58

- Figura 18:** a) DRX das (—) mNP e (—) mNP|A e em b) picos de DRX disponíveis na base de dados Inorganic Crystal Structure Database ICSD Number 082432. 60
- Figura 19:** Em a) estrutura espinélica cúbica de magnetita centrada na face. Em b) ampliação de um tetraedro e um octaedro adjacente compartilhando um átomo de oxigênio. Grandes esferas rotuladas por Fe_{tet} e Fe_{oct} representam átomos de ferro em sub-redes c..... 61
- Figura 20:** Espectro de FTIR das mNP (—) e mNP|A (—). 62
- Figura 21:** Representação da silanização das mNP com APTES. 63
- Figura 22:** Espectro de FTIR de mNP|A (—) e mNP|A-Ac (—). 64
- Figura 23:** Curvas de potencial zeta de mNP (■) e mNP|A (■). 65
- Figura 24:** Imagem de MET com ampliação de 100 nm das partículas de Fe_3O_4 (mNP). 67
- Figura 25:** Imagens de MET das partículas de Fe_3O_4 (mNP) e Fe_3O_4 |APTES (mNP|A) com ampliação de 50 e 20 nm respectivamente. 68
- Figura 26:** Histograma de distribuição de tamanho das partículas Fe_3O_4 @APTES (mNP|A). ... 69
- Figura 27:** (a) Curvas de histerese magnética em (1) mNP (—) e (2) mNP|A (—); em (b) Curvas de histerese magnética em (3) mNP|A-glut (—); (4) mNP|A-glut-Ac (—); (5) mNP|A-glut-Ac-bloq (—) e (6) mNP|A-glut-Ac-bloq-OMP (—). 70
- Figura 28:** Em a) diagramas de Nyquist em diferentes concentrações de mNP|A, volume fixo de 10,0 μ L sobre a superfície do mGCE; em b) diagramas de ângulo de fase referentes as diferentes concentrações de mNP|A. Avaliou-se as diferentes [mNP|A] sendo mGCE (■); 0,25 (●); 0,50 (▲); 0,65 (▼); 0,75 (◆) e 1,00 $mg\ mL^{-1}$ (◀). 71
- Figura 29:** Relação entre R_{tc} e concentração de mNP|A adicionada sobre a superfície do mGCE (■); índice de recobrimento θ (■) em função da concentração de mNP|A.. 73
- Figura 30:** Relação entre C_{dl} e concentração de mNP|A adicionada sobre a superfície do mGCE. 74
- Figura 31:** (a) Diagramas de Nyquist em diferentes volumes de mNP|A, concentração fixa de 0,75 $mg\ mL^{-1}$ sobre a superfície do mGCE; em (b) múltiplos diagramas de ângulo de fase referentes as diferentes volumes de mNP|A. Avaliou-se os diferentes volumes de mNP|A sendo mGCE (■); 2,5 (●); 5,0 (▲); 7,5 (▼); 10,0 (◆) e 12,25 μ L (◀).. 75
- Figura 32:** Em a), relação entre R_{tc} e volume de mNP|A adicionada sobre a superfície do mGCE (—); índice de recobrimento θ (—) em função do volume de mNP|A; em b) Relação entre C_{dl} (—) e volume de mNP|A adicionada sobre a superfície do mGCE..... 76
- Figura 33:** Diagramas de Nyquist em diferentes concentrações de Ac imobilizados sobre mNP|A em solução tampão PBS 10 mM, pH 7,5. Em a) após imobilização com Ac; em b) após bloqueio com glicina 0,5% m/v e em c) após incubação com OMP 150,0 $ng\ mL^{-1}$. Avaliou-se as diferentes [Ac] sendo 1,0 (■); 3,0 (●); 6,0 (▲); 7,5 (▼); 12,5 (◆); 25,0 (◀); 50,0 (▶); 75,0 e 100,0 $ng\ mL^{-1}$ (●). 78

Figura 34: Efeito da concentração de Ac imobilizada sobre mNP|A em cada etapa de preparo do dispositivo. Sendo mNP|A-Ac (-■-); mNP|A-Ac-bloq (-●-) e mNP|A-Ac-bloq-pep-OMP (-▲-). 79

Figura 35: Diagramas de Nyquist referentes a imobilização de Ac sobre mNP|A em diferentes valores de pH. Em (a) após imobilização com Ac; em (b) após bloqueio com glicina 0,5% m/v e em (c) após incubação com OMP 150,0 ng mL⁻¹. Avaliou-se os diferentes valores de pH sendo 5,0 (■); 5,5 (●); 6,0 (▲); 6,5 (▼); 7,0 (◆) e 7,5 (◄). 81

Figura 36: Relação entre a resposta eletroquímica e o pH do meio de imobilização de Ac. Sendo mNP|A-Ac (-■-); mNP|A-Ac-bloq (-●-) e mNP|A-Ac-bloq-pep-OMP (-▲-). 82

Figura 37: Diagramas de Nyquist em meio, contendo ou não, Tween 20 na etapa de imobilização e incubação com OMP. Em (a) após imobilização com Ac; em (b) após bloqueio com glicina 0,5% m/v e em (c) após incubação com OMP 150,0 ng mL⁻¹. Avaliou-se os meios reacionais sendo PBS(1) (■); PBST(1) (●); PBS(2) (▲) e PBST(2) (▼). 83

Figura 38: Relação entre a resposta eletroquímica e o pH do meio de imobilização de Ac. Sendo mNP|A-Ac (-■-); mNP|A-Ac-bloq (-●-) e mNP|A-Ac-bloq-pep-OMP (-▲-). 84

Figura 39: Diagramas de Nyquist referentes a diferentes concentrações de glutaraldeído sobre mNP|A. Avaliou-se os diferentes [glutaraldeído] sendo mNP|A (■); 0,1 (●); 0,5 (▲); 1,0 (▼); 2,5 (◆) e 5,0 % m/v (◄). 85

Figura 40: Diagramas de Nyquist referentes a imobilização de Ac sobre mNP|A em diferentes concentrações de glutaraldeído. Em (a) após imobilização com Ac; em (b) após bloqueio com glicina 0,5% m/v e em (c) após incubação com OMP 150,0 ng mL⁻¹. Avaliou-se os diferentes [glutaraldeído] sendo 0,1 (●); 0,5 (▲); 1,0 (▼); 2,5 (◆) e 5,0 % m/v (◄). 86

Figura 41: Efeito das diferentes concentrações de glutaraldeído na imobilização de Ac sobre mNP|A. Sendo mNP|A-glut(-■-); mNP|A-glut-Ac (-●-); mNP|A-glut-Ac-bloq (-▲-) e mNP|A-Ac-bloq-pep-OMP (-▼-). 87

Figura 42: Diagramas de Nyquist referentes aos diferentes tempos de imobilização de Ac na concentração de 6,0 ng mL⁻¹ sobre mNP|A. Avaliou-se os diferentes tempos de imobilização de Ac anti-HLB, sendo 0,25 (■); 0,50 (●); 1,0 (▲); 1,5 (▼); 2,0 (◆); 3,0 (◄); 4,0 (►); 6,0 (●) e 16 horas(★). 88

Figura 43: Efeito do tempo de imobilização de Ac sobre mNP|A no sinal impedimétrico. 89

Figura 44: Diagramas de Nyquist referentes aos diferentes tempos de bloqueio com solução de glicina 0,5 % m/v sobre mNP|A-Ac. Avaliou-se os diferentes [glicina], sendo 0,25 (■); 0,50 (●); 1,0 (▲); 1,5 (▼); 2,0 (◆); 3,0 (◄); 4,0 (►); 6,0 (●) e 16 horas(★). 90

Figura 45: Efeito do tempo de bloqueio com solução de glicina 0,5% m/v mNP|A-Ac no sinal impedimétrico. 91

Figura 46: Diagramas de Nyquist referentes aos diferentes tempos de incubação entre mNP|A-Ac, em a) meio reacional com ausência de surfactante Tween 20, em b) meio reacional com presença de surfactante Tween 20. Avaliou-se os diferentes tempos de incubação de pep-OMP, sendo 0,25 (■); 0,50 (●); 1,0 (▲); 1,5 (▼); 2,0 (◆); 3,0 (◀); 4,0 (▶); 6,0 (●) e 16 horas (★).. 92

Figura 47: Avaliação do sinal impedimétrico referente ao tempo de incubação de Ag na concentração de $150,0 \text{ ng mL}^{-1}$, em meio de solução tampão PBS 10 mM, pH 7,4, na ausência(-■-) e presença(-●-) de surfactante Tween 20. 93

Figura 48: Possível representação 3D de pep-OMP realizada no software Pymol..... 94

Figura 49: Diagramas de Nyquist referentes aos diferentes valores de pH empregados para a incubação de Ag e mNP|A-Ac. Avaliou-se os diferentes valores de pH sendo 5,0 (■); 5,5 (●); 6,0 (▲); 6,5 (▼); 7,0 (◆) e 7,5 (●)..... 95

Figura 50: Avaliação do sinal impedimétrico referente ao pH do meio de incubação de Ag na concentração de $150,0 \text{ ng mL}^{-1}$, em meio de solução tampão PBST 10 mM. 96

Figura 51: Relação do sinal impedimétrico em função das diferentes diluições de Ac (-■-) e Ag (-●-), partindo de um estoque de $6,0 \text{ ng mL}^{-1}$ 97

Figura 52: Diagramas de Nyquist referentes as diferentes concentrações de pep-OMP, intervalo de $0,0 \text{ fg mL}^{-1}$ - $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$. Avaliou-se as diferentes [pep-OMP] em meio de solução de PBST 10,0mM pH 7,5; sendo $0,0 \text{ fg mL}^{-1}$ (■); $1,0 \text{ fg mL}^{-1}$ (●); $10,0 \text{ fg mL}^{-1}$ (▲); $100,0 \text{ fg mL}^{-1}$ (▼); $500,0 \text{ fg mL}^{-1}$ (◆); $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$ (◀); $10,0 \text{ pg mL}^{-1}$ (▶) e $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$ (●). 98

Figura 53: Curva analítica construída, pep-OMP no intervalo de $1,0 \text{ fg mL}^{-1}$ a $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$. As barras de erro mostram o desvio padrão obtido a partir da triplicata dos dados dos experimentos. 99

Figura 54: Em (a) Diagramas de Nyquist e em (b) diagramas de Bode das etapas de construção do biossensor. (c) CEE ajustado para mGCE e mNP|A e m (d)) CEE austado para mNP|A-Ac e mNP|A-Ac-OMP. Sendo 1) mGCE (■) e ajuste matemático (—); 2) mNP|A (●) e ajuste matemático (—); 3) mNP|A-Ac (▲) e ajuste matemático (—) e 3) mNP|A-Ac-pep-OMP (●) e ajuste matemático (—). 102

Figura 55: Gráfico de Hanes-Woolf. 106

Figura 56: Estabilidade das mNP|A-Ac nas diferentes condições de estocagem. Em a) material estocado em suspensão a temperatura ambiente em banca a 25°C (SpA-mNP@-Ac); em b) material estocado em suspensão em geladeira a temperatura de 4°C (SpG-mNP@-Ac) e em c) material liofilizado (L-mNP|A-Ac). 108

Figura 57: Diagramas de Nyquist referente as diferentes formas de “clean up” avaliadas. Em a) amostras não fortificadas e em b) amostras fortificadas com $500,0 \text{ fg mL}^{-1}$ de pep-OMP. As diferentes formas de “clean up” estão indicadas como 1) resposta nas condições otimizadas em meio de solução tampão PBST 10,0 mM pH 7,5 (■); 2) amostra sem etapa de centrifugação (●); 3) amostra com etapa de centrifugação (▶) e 4) uso de kaolin (◀). 109

Figura 58: Valores de R_{tc} mensurados nas diferentes maneiras de “*clean up*” avaliadas; em a) mNP|A-Ac incubadas por 3,0 h em pull de extratos de folhas de plantas cítricas negativas ao C.Las (branco) (■) e mNP|A-Ac incubadas por 3,0 h em pull de extratos de folhas de plantas cítricas negativas ao C.Las fortificadas com $500,0 \text{ fg mL}^{-1}$ de pep-OMP (fortificado) (●). Em b) valores de $\Delta R_{tc} = R_{tc}$ após fortificação - R_{tc} branco. 110

Figura 59: Adição de padrão em “pull” de amostras de extratos vegetais cítricos fortificada com $1,0 \text{ fg mL}^{-1}$ Pep-OMP. 111

Figura 60: Valores de ΔR_{tc} para amostras de extratos de folhas de plantas cítrica; sendo amostras negativas a C.Las. (■) e amostras positivas a C.Las. (●). 113

Figura 61: Representação gráfica “Box plot” dos valores de ΔR_{tc} exibidos pelas amostras L2.1, L3.1, L4.1, L6.1 e L9.1 em função do número de lavagens utilizando solução tampão PBST $10,0 \text{ mM pH } 7,5$ após incubação com mNP|A-Ac. Sendo valor de ΔR_{tc} mensurado após 3 etapas de lavagem (◆); após 5 etapas de lavagem (◆) e após 7 etapas de lavagem (◆). 116

Figura 62: Em a) mNP|A-Ac incubadas por 3,0 h em pull de extratos de folhas de plantas cítricas negativas a *Ca. Liberibacter spp.* (branco) (■) e mNP|A-Ac incubadas por 3,0 h em pull de extratos de folhas de plantas cítricas negativas a *Ca. Liberibacter spp.* fortificadas com $500,0 \text{ fg mL}^{-1}$ de pep-OMP (fortificado) (●). Em b) valores de $\Delta \Delta R_{tc} = \Delta R_{tc}$ após fortificação - ΔR_{tc} branco. 117

Figura 63: Valores de ΔR_{tc} para amostras de extratos de folhas de plantas cítrica; sendo amostras negativas a *Ca. Liberibacter spp.* (■) e amostras positivas a C.Las (●). 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de laranja por região do cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais.....	6
Tabela 2: Características ideais de um biossensor.	20
Tabela 3: Combinação dos diferentes meios de imobilização de Ac e captura de Ac.	49
Tabela 4: Relação entre as diferentes diluições de Ag e Ac empregadas, partindo de concentrações estoque de $6,0 \text{ ng mL}^{-1}$	51
Tabela 5: Identificação das 20 primeiras amostras de extratos de folhas de plantas cítricas.....	55
Tabela 6: Identificação das amostras de extratos de folhas de plantas cítricas avaliadas para diagnóstico de C.Las utilizando o imunossensor impedimétrico.	57
Tabela 7: Figuras de mérito.....	100
Tabela 8: Parâmetros obtidos na caracterização do eletrodo de carbono vítreo por EIE nas diferentes etapas de modificação.....	101
Tabela 9: Comparativo entre os valores de ΔR_{tc} e C_t exibidos pelas diferentes amostras de extratos de folhas de plantas cítricas.....	114
Tabela 10: Comparativo entre os valores de ΔR_{tc} e C_t exibidos pelas diferentes amostras de extratos de folhas de plantas cítricas.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Ampere

a : Amplitude de perturbação

Ac: Anticorpo

AC: Corrente alternada

Ag: Antígeno

APTES: (3-Aminopropil) trietoxissilano

AS: Assintomática

ATR: Reflectância total atenuada

C: Capacitância

C_{dl} : Capacitância da dupla camada eletroquímica

C_i^0 : Concentração real de espécies na interface de trabalho

C_i^b : Concentração das espécies no seio da solução

C_∞ : Concentração do analito no seio da solução

Ca. L. americanus ou *C.Lam*: *Candidatus Liberibacter americanus*

Ca. L. asiaticus ou *C.Las*: *Candidatus Liberibacter asiaticus*

CEE: Circuito elétrico equivalente

CPE: Constant phase element – elemento de constante de fase

Ct: Cycle threshold – ciclo limiar

CTV: Virus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*)

CVC: Clorose variegada dos citros

D: Coeficiente de difusão

DCE: Dupla camada elétrica

DEF: Deficiência de nutrientes

d_{med} : Diâmetro médio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxinucleotídeos trifosfatos

DRX: Difractometria de raios X

E: Potencial elétrico

E^0 : Potencial padrão

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EIE: Espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EtOH: Etanol

F: Constante de Faraday

Fe_3O_4 : Magnetita

FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

glut: glutaraldeído

H_c : Campo coercitivo

HLB: Huanglongbing

Hz: Hertz

I: Corrente elétrica

I_0 : Corrente de troca

ICSD: Inorganic crystal structure database

Ig: Imunoglobulina

IHP: Plano interno de Helmholtz

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

j : Operador imaginário

K: Kelvin

k^0 : Constante de transferência eletrônica

K_d : Constante de dissociação

kDa: Quilodalton

kg: Quilograma

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

mGCE: Eletrodo de trabalho de carbono vítreo contendo em seu interior um ímã de neodímio

min: min

mNP|A: Magnetita-APTES

mNP|A-glut: Magnetita-APTES-glutaraldeído

mNPs: nanopartículas magnéticas

MOSQ: Mosqueado

M_R : Magnetização remanescente

M_s : Magnetização de saturação

MVA: Manchas verdes e amarelas

n: número de elétrons por mol de substância

N_2 : Gás nitrogênio

NA: Nervura central amarela

ng: Nanograma

nm: Nanometro

OCP: Open circuit potential - potencial de circuito aberto

OMP: Outer membrane protein

OPH: Plano de externo Helmholtz

PBS: solução tampão fosfato salino

PBST: solução tampão fosfato salino contendo surfactante Tween 20

PCR: Polymerase chain reaction - reação em cadeia da polimerase

pep-OMP: peptídeo-OMP (antígeno empregado para produção do anticorpo anti-HLB)

qPCR: PCR quantitativo

r: Coeficiente de correlação

R: Constante dos gases

R: Resistor

rpm: Rotação por minuto

R_s : resistência da solução eletrolítica

R_{tc} : resistência de transferência de carga

R_{tcl} : resistência a transferência de cargas do eletrodo sem modificação.

R_{tcm} : resistência a transferência de cargas do eletrodo após modificação

SAM: Self-assembled monolayer – monocamada automontada

SD: Desvio padrão

sin: Função trigonométrica seno

SiO₂: Óxido de silício

t: Tempo

T: Tesla

tan: função trigonométrica tangente

V: Volt

v: Volume

VSM: Vibrating Sample Magnetometer

$\bar{x}$: Média aritmética

Z: Impedância total

Z': Impedância real

-Z'': Impedância imaginária

Z_{CPE}: Reatância capacitiva

Z_w: Impedância de Warburg

δ : deformações angulares representadas

ΔR_{tc} : R_{tc} após etapa incubação com Ag - R_{tc} anterior a etapa de incubação com Ag (branco)

$\Delta \Delta R_{tc}$ = ΔR_{tc} após fortificação - ΔR_{tc} branco.

μg : Micrograma

μL : Microlitro

$2\theta_f$: Ângulo final

$2\theta_i$: Ângulo inicial

θ : Índice de recobrimento

ϕ : Ângulo de fase

$\emptyset$: Diâmetro médio de poro

v: Deslocamento axial

$^{\circ}\text{C}$: Grau Celsius

σ : Coeficiente de difusão de Warburg

Ω : ohm

% Rec: Porcentagem de recuperação

ω : Frequência angular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
<i>1.1.</i>	<i>Aspectos históricos e econômicos da citricultura</i>	<i>1</i>
<i>1.2.</i>	<i>Pragas que afetam a citricultura</i>	<i>7</i>
<i>1.3.</i>	<i>Huanglongbing (HLB) ou greening.....</i>	<i>8</i>
<i>1.4.</i>	<i>Identificação e detecção de HLB em citros.....</i>	<i>11</i>
<i>1.5.</i>	<i>Biossensores: definições e propriedade.....</i>	<i>19</i>
<i>1.6.</i>	<i>Espectroscopia de impedância eletroquímica</i>	<i>30</i>
2.	OBJETIVO	41
3.	METODOLOGIA	42
<i>3.1.</i>	<i>Reagentes e soluções</i>	<i>42</i>
<i>3.2.</i>	<i>Síntese e modificação de mNP.....</i>	<i>43</i>
<i>3.3.</i>	<i>Caracterizações físicas</i>	<i>44</i>
<i>3.4.</i>	<i>Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....</i>	<i>45</i>
<i>3.5.</i>	<i>Avaliação da concentração e volume de mNP A sobre m-GCE.....</i>	<i>46</i>
<i>3.6.</i>	<i>Otimização dos parâmetros experimentais de construção do imunossensor impedimétrico</i>	<i>46</i>
<i>3.6.1.</i>	<i>Concentração de anticorpo anti-HLB.....</i>	<i>46</i>
<i>3.6.2.</i>	<i>Efeito do pH do meio de imobilização de Ac-HLB</i>	<i>48</i>
<i>3.6.3.</i>	<i>Emprego de Tween 20 na imobilização de Anti-HLB</i>	<i>48</i>
<i>3.6.4.</i>	<i>Concentração de glutaraldeído</i>	<i>49</i>
<i>3.6.5.</i>	<i>Tempo de imobilização de Ac sobre mNP A.....</i>	<i>50</i>
<i>3.6.6.</i>	<i>Tempo de bloqueio de mNP A-Ac</i>	<i>50</i>
<i>3.6.7.</i>	<i>Tempo de incubação de mNP A-Ac com OMP.....</i>	<i>50</i>
<i>3.6.8.</i>	<i>Efeito do pH do meio de incubação entre mNP A-Ac e Ag pep-OMP</i>	<i>50</i>
<i>3.6.9.</i>	<i>Variação da diluição de Ac e Ag.....</i>	<i>51</i>
<i>3.7.</i>	<i>Construção de curva analítica</i>	<i>52</i>

3.8.	<i>Estabilidade do imunossensor impedimétrico.....</i>	52
3.9.	<i>Aplicação em amostras de extratos de folhas de plantas cítricas.....</i>	52
3.9.1.	Preparo de extratos cítricos para análise em biossensor	52
3.9.2.	“Clean up” da amostra.....	53
3.9.3.	Construção de curvas de recuperação	54
3.9.4.	Otimização das condições de análise de EIE em amostras de extratos de folhas de plantas cítricas.....	54
3.10.	<i>Diagnóstico de HLB em amostras de extratos de folhas de plantas cítricas</i>	56
3.10.	<i>Extração de DNA vegetal e procedimento qPCR.....</i>	58
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
4.1.	<i>Caracterizações físicas</i>	60
4.1.1.	Difratometria de raios X.....	60
4.1.2.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio com transformada de fourier (FTIR)	62
4.1.3.	Potencial zeta (ζ)	64
4.1.4.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	66
4.1.5.	Magnetometria de amostra vibrante (VSM).....	69
4.2.	<i>Avaliação da concentração de mNP A.</i>	70
4.3.	<i>Volume de mNP A.....</i>	75
4.4.	<i>Concentração de anticorpo anti-HLB imobilizado</i>	77
4.5.	<i>pH do meio reacional de imobilização de Ac-HLB.....</i>	80
4.6.	<i>Influência de tween 20</i>	82
4.7.	<i>Efeito da concentração de glutaraldeído.....</i>	85
4.8.	<i>Tempo de imobilização de anticorpo</i>	88
4.9.	<i>Tempo de bloqueio</i>	90
4.10.	<i>Tempo de incubação Ac-Ag.....</i>	91
4.11.	<i>Efeito do pH do meio de incubação entre mNP A-Ac e Ag pep-OPM</i>	94
4.12.	<i>Diluição de Ac e Ag.....</i>	96

4.13.	<i>Curva analítica</i>	97
4.14.	<i>Descrição do circuito elétrico equivalente (CEE)</i>	100
4.15.	<i>Determinação da constante de dissociação Ac-Ag</i>	104
4.16.	<i>Estudo da estabilidade de Ac imobilizados sobre mNP A</i>	106
4.17.	<i>Aplicação em amostras de extratos vegetais</i>	108
5.	CONCLUSÃO	122
6.	REFERÊNCIAS	124

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos históricos e econômicos da citricultura

O termo citros refere-se a todas as espécies pertencentes ao gênero *Citrus* spp., bem como, os gêneros *Poncirus* e *Fortunella* sp. e híbridos destes gêneros também são caracterizados como frutos cítricos. Dessa forma quando o termo for mencionado, caracteriza-se como todas as espécies pertencentes a família das *Rutaceae*. (LURO et al., 2017; SCORA, 1975) Assim sendo classifica-se como citrus todas as variedades de limões (*Citrus limonum*), toranja (*Citrus máxima*), tangerinas (*Citrus reticulata*) e laranjas (*Citrus sinensis*). (CITRUSBR, 2021)

Devido à forma como foram disseminados os frutos e sementes das espécies que compõem o gênero *Citrus*, é difícil determinar o local exato de origem destes. No entanto, os primeiros registros datam de cerca 2000 a.C, nos quais o termo “*Citruts*” foi mencionado na lista de tributos que seriam oferecidos ao Imperador Yu na dinastia Hsia, na atual região da China. Nos dias de hoje, sabe-se que as espécies de citros se originaram nas regiões tropicais e subtropicais do Sudeste Asiático, em uma ampla faixa de terra, situada aproximadamente entre os paralelos 15°N e 25°N e meridianos 90°E e 115°E. (CITRUSBR, 2021; GMITTER; HU, 1990; LURO et al., 2017; SCORA, 1975)

Com o desenvolvendo da humanidade, as plantas de citros foram espalhadas pelo planeta. Nos meados dos anos de 323 a.C, há registros utilizando o termo “*Citron*” em documentos do Imperador romano Alexandre, O Grande. Nestes documentos relata-se o cultivo de frutas cítricas dentro dos limites de seu império por agrônomos de Roma. Com a queda do império romano e a expansão moura sobre a região do Oriente Médio, Mediterrâneo, Norte da África e Península Ibérica, árvores de laranja azeda (*Citrus aurantium*) eram descritas por volta 1.150 d.C. como plantas ornamentais e dotada de características extraordinárias. Seu plantio era muito comum nos pátios das casas árabes abastadas, geralmente associada a uma fonte ou a um lago e já eram conhecidas suas propriedades alimentícias e medicinais. (GMITTER; HU, 1990; SCORA, 1975)

A chegada dos citros nas Américas se deu por meio de Cristóvão Colombo, em uma de suas expedições no sec. XV. Desta maneira, foram levadas as primeiras frutas para as Antilhas e Haiti que posteriormente foram dispersas. Já era de conhecimento geral que plantas cítricas tinham como objetivo criar um abastecimento de vitamina C, substância que era

utilizada como antídoto do escorbuto, doença que eliminava as tripulações no período das Grandes Navegações. (GMITTER; HU, 1990; SCORA, 1975) A Figura 1 exibe o caminho percorrido pelos citros desde a sua saída da região da China por volta do ano 2000 a.C até sua chegada ao Novo Mundo no século XV.

Figura 1: Rota de dispersão de citros pelo mundo. 1) Indochina, 2) Oriente Médio; 3) Norte da África, 4) Península Ibérica, 5) Caribe e 6) Brasil.



Fonte: Autoria própria.

No Brasil, os primeiros frutos vieram com a colonização portuguesa mais precisamente no ano de 1530 na Bahia. Devido à adaptação geográfica e climática das plantas ao novo continente, os novos habitantes plantavam as árvores de citros nos pomares de suas propriedades onde, por volta de 1800 na cidade de Salvador, foi identificado uma variedade brasileira denominada de laranja Bahia, baiana ou laranja de umbigo, dando assim início a citricultura brasileira. (GMITTER; HU, 1990; RIBEIRO ROSSI; VITALE TORKOMIAN, 2015; SCORA, 1975)

A partir deste momento, a laranja Bahia foi amplamente propagada através de mudas enxertadas. Devido a fatores diplomáticos, técnicos norte-americanos em citricultura da cidade de Riverside, no estado da Califórnia, receberam três mudas de laranja Bahia. Este intercâmbio foi fundamental para o início da citricultura nos dois países. (CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MULLER, 1989; RIBEIRO ROSSI; VITALE TORKOMIAN, 2015)

Inicialmente o plantio de árvores cítricas tinha apenas caráter doméstico, sendo cultivada em quintais urbanos e rurais para consumo familiar, assim no período preliminar a

evolução da citricultura coincide com os acontecimentos históricos ocorridos no Brasil no período de 1822 a 1889. Neste período houve grandes mudanças na produção agrícola do país, em que a produção de açúcar deu espaço ao café, e no trabalho houve uma substituição da mão de obra escrava pelos imigrantes europeus. (CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MULLER, 1989)

As geadas de 1918 e 1929, fizeram com que o cultivo do café diminuísse no Estado de São Paulo possibilitando assim a abertura de espaço para a produção de outras culturas agrícolas, oferecendo condições básicas de infraestrutura operacional e econômico-financeira herdadas da cultura cafeeira. A rota citrícola foi a mesma do café ao longo das principais linhas ferroviárias que cruzavam o estado de São Paulo, fator importante por se tratar de um produto perecível. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MAIA, 1992; MULLER, 1989)

O crescimento da citricultura paulista foi cessado por uma crise econômica e fitossanitária no final da década 40 e início da década de 50 do século XX, tendo como agravante a II Guerra Mundial, a qual trouxe uma diminuição de 77% das exportações de fruta *in natura* para a Europa. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; KALATZIS; ALVES; PAULILLO, 1999; MAIA, 1992; MULLER, 1989)

Esta baixa nas exportações ocasionou uma diminuição de recursos financeiros dos produtores para manutenção dos pomares. Assim, foi necessário que o governo do estado de São Paulo interferisse no mercado, comprando as laranjas no interior e vendendo na capital, sem objetivo de lucro. Essa ação visava apenas aumentar o consumo das laranjas e tangerinas que se perdiam nos pomares. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MAIA, 1992; MULLER, 1989)

Como solução, o porta-enxerto de limão cravo (*Citrus × limonia*) foi a solução encontrada para o combate da Tristeza dos citros, pois este apresenta resistência à disseminação da doença da raiz para a copa das plantas infectadas. Com a retomada dos investimentos no setor no final dos anos 50, houve uma expansão agrícola para as regiões norte e nordeste do estado de São Paulo. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MAIA, 1992; MULLER, 1989)

Apesar da recuperação dos pomares paulistas e da retomada da produção e exportação citrícola no Brasil, foi também na década de 1950 que entrou em cena um novo personagem, com traços marcantes e duradouros, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, agente do cancro cítrico. Originária da Ásia, essa bactéria causadora de lesões nos frutos, folhas e ramos

entrou no Brasil por meio de mudas trazidas clandestinamente do Japão. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MAIA, 1992; MULLER, 1989)

Influenciado pelo ritmo de crescimento da população mundial e restabelecimento da economia no período pós II Guerra Mundial, houve um aumento na procura e consumo de frutas pelos países atingidos, assim, elevando os valores pagos por produtos do gênero. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MAIA, 1992; MULLER, 1989; RIBEIRO ROSSI; VITALE TORKOMIAN, 2015).

Este aumento favoreceu o surgimento, no final dos anos 40 nos USA, das primeiras empresas de produção e/ou exportação de suco concentrado de laranja, consolidando o país como maior produtor de laranjas do mundo no ano de 1960. Entretanto, devido a uma forte geada no natal de 1962 ocorrida na Flórida, principal região produtora de laranja dos USA, houve uma eliminação de 13 milhões de laranjeiras, acarretando uma queda de 50% da produção norte-americana. Em termos numéricos, na safra 1961/1962 a produção foi de 115,878 milhões de galões de suco, enquanto em 1962/1963 caiu para 51,387 milhões, diminuindo assim a oferta no mercado e consequentemente dobrou o valor do galão, de 2,0 a 2,5 para 3,5 a 4,0 dólares. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; MAIA, 1992; MULLER, 1989; RIBEIRO ROSSI; VITALE TORKOMIAN, 2015)

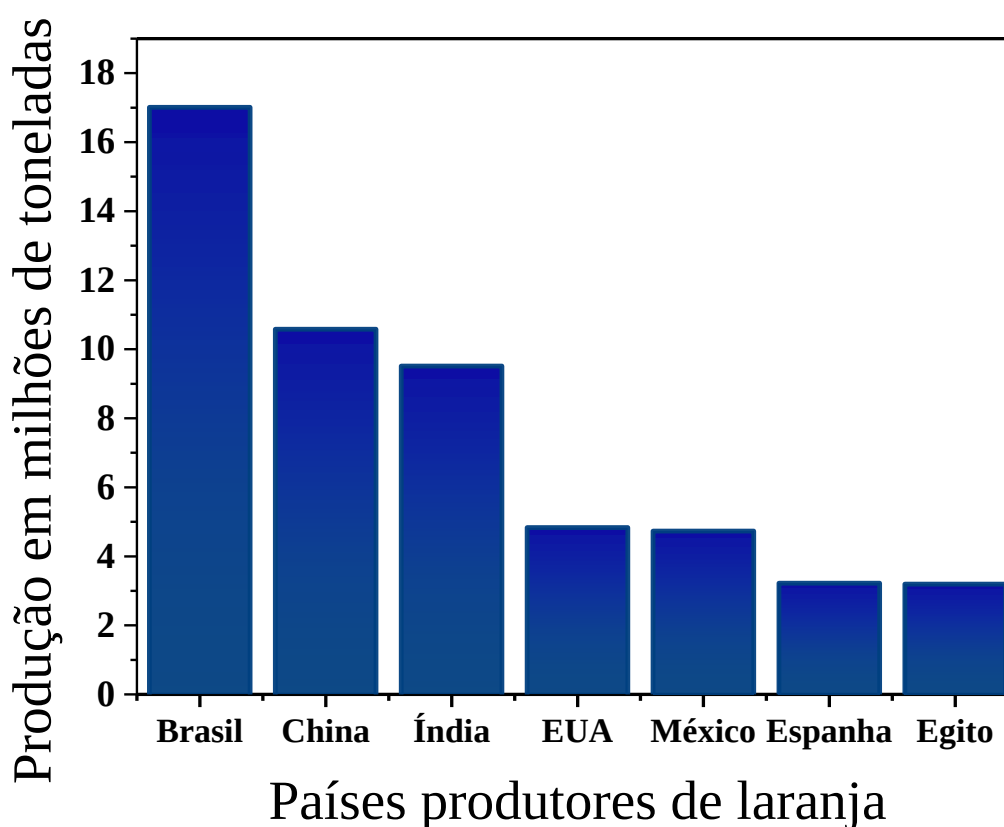
A crise na produção norte-americana foi determinante para a abertura de espaço no mercado mundial de suco concentrado. Como o Brasil que estava em uma fase de modernização de sua agricultura, caracterizada justamente pela desarticulação do chamado “complexo rural”, com a constituição dos “complexos agroindustriais”, os quais se dariam através da substituição da economia rural por atividades agrícolas integradas à indústria, pela intensificação da divisão do trabalho e das trocas intersetoriais e com a especialização da produção agrícola, o Brasil foi estimulado a ingressar nesse mercado, tornando-se um dos países que mais se beneficiaram com a crise da produção americana. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; HASSE, 1987; KALATZIS; ALVES; PAULILLO, 1999; MAIA, 1992; MULLER, 1989; RIBEIRO ROSSI; VITALE TORKOMIAN, 2015)

Ao longo dos anos 1980 a 1990, houve uma intensificação na demanda externa de suco concentrado de laranja juntamente com a implantação do contrato-padrão entre os citricultores e as indústrias do setor. Devido a conflitos fitossanitários e econômicos houve uma reestruturação da citricultura paulista, proporcionando a criação de associações de produtores e atuação do estado na legislação do setor. Isso refletiu no aumento da qualidade do suco

produzido, passando a ter padrões internacionais denominados de FCOJ (Frozen Concentrated Orange Juice), tornando-se uma comódite. (BORGES; MIRANDA COSTA, 2005; CARVALHO et al., 2019; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2021; KALATZIS; ALVES; PAULILLO, 1999)

Em termos numéricos, (Figura 2), o Brasil produziu 10,7 milhões de toneladas de laranja na safra 2022 (NEVES et al., 2011), estes números refletem 33% da produção mundial de laranja, sendo 53% destinado à produção de suco concentrado e cerca de 85% da produção é exportada. (AGRONEGÓCIO, 2022; COSTA; GUILHOTO; IMORI, 2013; FUNDECITRUS, 2021a) A China produziu 10,6 milhões de toneladas em 2021/2022, sendo a região de Jiangxi a maior produtora do país. Os EUA produziram 5,6 milhões de toneladas, com a Califórnia respondendo por 62% da produção total de citros dos EUA, Flórida 36% e Texas e Arizona produzindo os 2% restantes. (CITRUS INDUSTRY MAGAZINE, 2022) Na União Europeia, a Espanha é o maior produtor de laranjas do continente, com 3,2 milhões de toneladas produzidas no mesmo período. (EUROPEAN COMMISSION, 2022)

Figura 2: Classificação dos países produtores de laranja do mundo em milhões de toneladas.



Fonte: (AGRONEGÓCIO, 2022; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2021; NATIONMASTER, 2022).

Toda a produção brasileira está concentrada no denominado de cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais, região geográfica que engloba 481 municípios e 12 mil fazendas, totalizando uma área plantada de mais de 400 mil hectares. O cinturão citrícola é subdividido em cinco macrorregiões (norte, noroeste, centro, sul e sudoeste), que por sua vez são subdivididas em microrregiões distintas. Na Tabela 1 estão dispostos os valores de produção em milhões de caixas de laranja de cada região e as microrregiões pertencentes a cada uma destas. (CITRUSBR, 2021; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2021; FUNDECITRUS, 2021b; NATIONMASTER, 2022)

Tabela 1: Produção de laranja por região do cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais.

Macrorregião	Microrregião	Milhões de caixas de laranja
Norte	Triângulo Mineiro	67,55
	Bebedouro	
	Altinópolis	
Noroeste	Votuporanga	21,95
	São José do Rio Preto	
Centro	Duartina	70,78
	Matão	
	Brotas	
Sul	Porto Ferreira	45,85
	Limeira	
Sudoeste	Avaré	56,84
	Itapetininga	

Fonte: (CITRUSBR, 2022; FUNDECITRUS, 2022a).

Na safra 2022, os embarques de suco de laranja brasileiro atingiram 658.448 toneladas. Em receita, as exportações somaram US\$ 1.067 bilhões, causando uma arrecadação de impostos de US\$ 180 milhões e gerando 200 mil empregos diretos e indiretos, de acordo com a Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (CitrusBR). (CNA, 2022; GROUP, 2022; NEVES, 2018; S.A, 2022)

Diante do exposto, observa-se que o Brasil representa uma importante participação na produção mundial de laranja, impactando de forma direta e indireta a economia do país e a vida dos trabalhadores do setor. Como a maior parte desta produção tem como objetivo a exportação para os mercados europeus e norte-americanos, o monitoramento fitossanitário dos pomares é de suma importância, pois as diferentes pragas que acometem as plantações de citros diminuem de forma significativa a produção, acarretando um déficit na quantidade e qualidade da laranja consumida pelo mundo.

1.2. Pragas que afetam a citricultura

As doenças que afetam a citricultura podem ser causadas por diferentes tipos de microrganismos, que podem ser fungos, vírus ou bactérias. Estes dependem de fatores climáticos, geográficos e/ou biológicos para a sua propagação nos pomares, expressão de sintomas para que possam ser identificadas as possíveis doenças. (EL KAHLOUT; ABU-NASER, 2019)

Entre as doenças causadas por fungos que afetam a citricultura, destacam-se a Pinta Preta proveniente da infecção com fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (CHUNG; PERES; TIMMER, 2019; TRAN et al., 2017) e a Podridão Floral, ocasionada pelas diferentes espécies de fungos dos complexos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, sendo a principal espécie *C. abscissum*, que pertence ao complexo *C. acutatum*. (KURAMAE-IZIOKA et al., 1997; TIMMER; PERES, 2015)

Em relação a doenças causadas por vírus que atacam de forma significativa a citricultura, ressalta-se a Leprose dos Citros, causada pelo vírus *Citrus leprosis virus* (CiLV), classificado como pertencente à família *Cilevirus*. O CiLV é transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*, assim favorecendo a rápida dispersão entre os pomares produtores de citros, as plantas apresentam sintomas iniciais entre 2 a 3 após infecção, sendo os principais o surgimento de lesões arredondadas e lisas nas folhas, de coloração de verde-pálida a amarela, e pode haver ocorrência de anéis necróticos no centro; nos frutos, as lesões geralmente são rasas e necróticas, distribuídas por toda a superfície. Nos frutos verdes, observa-se um halo amarelo em torno da lesão e, à medida que ele amadurece, as lesões se tornam escuras e pouco deprimidas. Ataques intensos provocam a queda dos frutos, principalmente no caso em que as lesões estão próximas ao pedúnculo. (BASSANEZI et al., 2019; KITAJIMA; CHAGAS; RODRIGUES, 2003; LOCALI-FABRIS et al., 2006)

A Tristeza dos Citros é ocasionada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), vírus este que é restrito ao floema das plantas pertence ao gênero *Closterovirus*. Como meio de propagação, há dois vetores biológicos, o pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida*) e o piolho do algodão (*Aphis gossypii*), que se alimentam do floema das plantas cítricas infectadas, assim o vírus permanece retido no trato digestório dos insetos por até 24 a 36 horas, possibilitando a infecção de novas plantas. (BAR-JOSEPH; MARCUS; LEE, 1989; GARNSEY, S. M.; LEE, 1989;

LEON M. et al., 2006; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA; RODRIGUES, 2005; NIBLETT et al., 2000)

Com relação às infecções por bactérias, destacam-se o Cancro Cítrico, provocada pela *Xanthomonas citri subsp. citri*, classificada como gram-negativa, e propagada pelas gotículas água contaminadas que são levadas pelo vento que entram em contato com os estômatos das folhas. A entrada da bactéria nas plantas é favorecida pela presença da lagarta minadora dos citros *Phyllocnistis citrella*, que realiza a abertura de entradas canais nas folhas.

A doença Huanglongbing (HLB) é causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter americanus* (*Ca. L. americanus*) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Ca. L. asiaticus*). (GOTTWALD, 2013; TEIXEIRA et al., 2008a). Também conhecido como “greening”, esta foi identificada pela primeira vez na China, no ano de 1995, o termo huanglongbing significa “doença do ramo amarelo”, devido aos sintomas que as plantas positivas apresentam em suas folhas. (BOVÉ; BARROS, 2006; DA GRAÇA et al., 2016)

1.3. Huanglongbing (HLB) ou greening

No ano de 2004 foi confirmado o primeiro caso de HLB, no município de Araraquara/SP, e em cerca de um ano após a identificação do patógeno na região, o "greening" atingiu 47 municípios do estado de São Paulo. Após essa identificação, a doença passou a ser considerada o principal problema fitossanitário dos citros do país. (TEIXEIRA et al., 2008a)

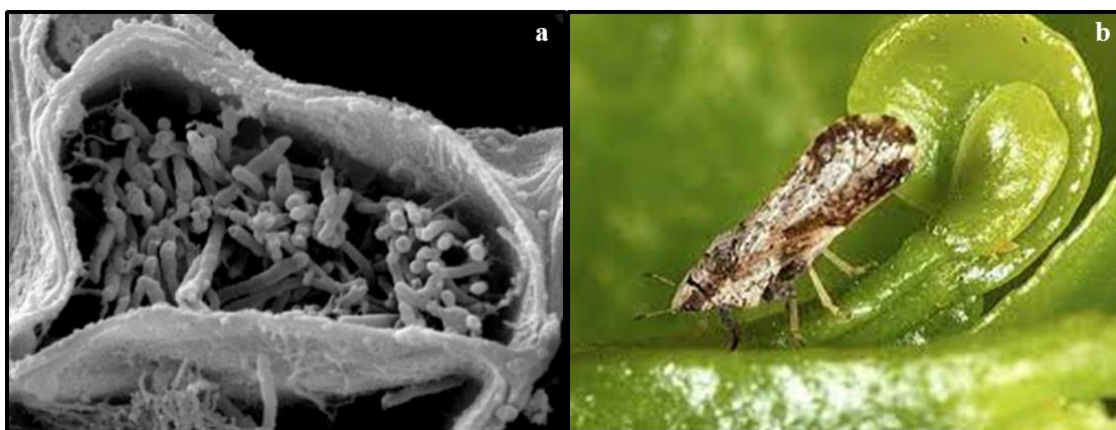
Nos EUA o HLB foi reconhecido pela primeira vez em Miami, no estado da Flórida, em 2005; no ano seguinte, a doença já havia contaminado os citros de doze condados da Flórida. A área de plantio na Flórida diminuiu 30% desde o surto da doença em 2005, juntamente com um declínio de 74% na produção. Os danos estimados da doença nos últimos 5 anos somam mais de US\$ 1 bilhão por ano, com quase 5.000 empregos perdidos anualmente. Estima-se que 90% a área cultivada e 80% das árvores cítricas na Flórida sejam afetadas pela doença. (DA GRAÇA et al., 2016; LI et al., 2020)

No Brasil estima-se que do ano 2005, ano em que teve início o controle oficial do HLB por meio da erradicação de plantas infectadas, até julho de 2011, só no Estado de São Paulo, mais de 12 milhões de árvores de laranja foram erradicadas com sintomas da doença. (BASSANEZI et al., 2011; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JR.; J.; SPOSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, 2010) Na safra 2020/2021, segundo levantamento realizado pelo FUNDECITRUS, 22,37% das laranjeiras do

cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro estão contaminadas com HBL, esse percentual equivale a 41 milhões de árvores. (FUNDECITRUS, 2001, 2021c)

O HLB é causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter americanus* (*Ca. L. americanus*) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (*Ca. L. asiaticus*), as quais são bactérias do tipo gram-negativas pertencentes a família *Rhizobiaceae*, possuem morfologia baciliforme com tamanhos entre 2 a 3 μm , Figura 3a. São bactérias restritas ao floema e sua transmissão ocorre pelo psíldeo *Diaphorina citri*, Figura 3b. Ele adquire a bactéria ao se alimentar nas plantas doentes e a transmite ao se alimentar nas sadias. Tanto a aquisição quanto a transmissão da bactéria ocorrem depois de 15 min de alimentação, mas quanto mais tempo ele se alimenta, maiores são as taxas. (DA GRAÇA et al., 2016; DUAN et al., 2009; FUNDECITRUS, 2019)

Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura em vasos do floema de citros com *Candidatus Liberibacter asiaticus* e b) psíldeo *Diaphorina citri*.

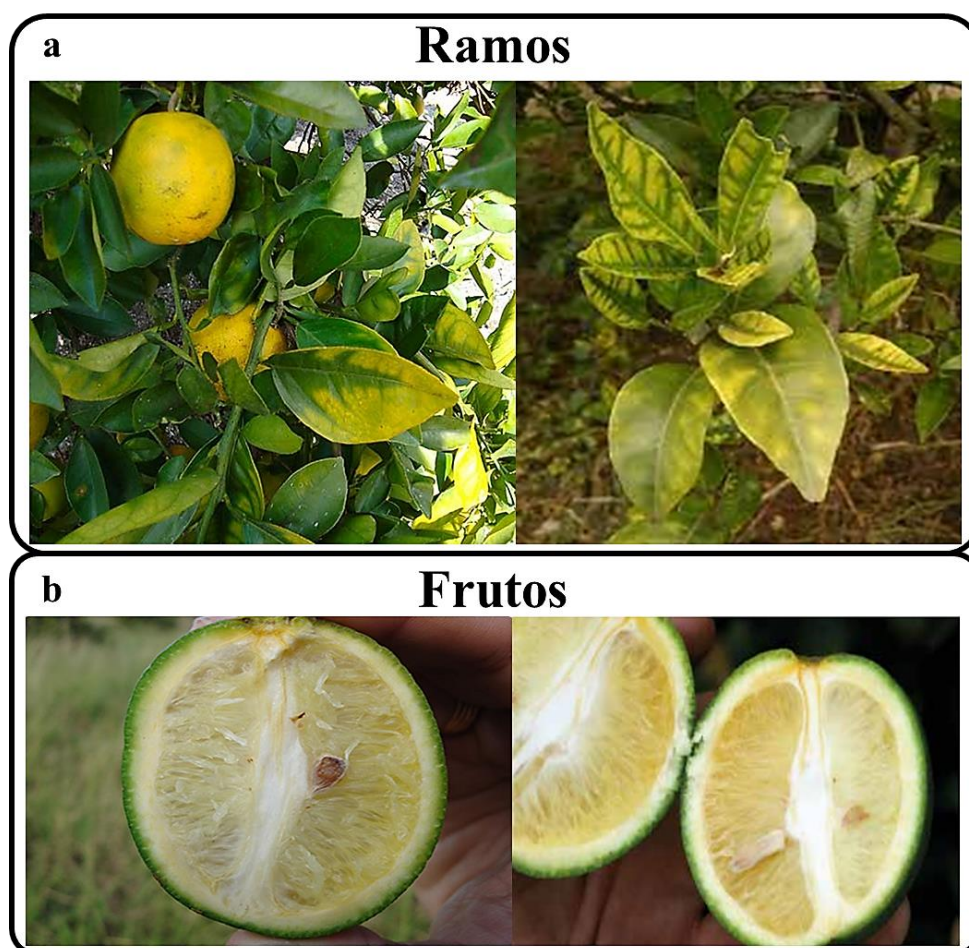


Fonte: (FUNDECITRUS, 2019; TANAKA et al., 2007).

O sintoma característico do HBL é a presença de um ou mais ramos com folhas amareladas, quando jovens, e mosqueadas, quando maduras. O mosqueado se caracteriza por manchas irregulares no limbo foliar, que alternam gradativamente entre o verde e o amarelo, sem simetria entre as duas metades da folha. Em alguns casos, a nervura da folha fica grossa e mais clara (amarelada), podendo também ficar áspera (corticosa), conforme mostrado na Figura 4a. Os frutos apresentam amadurecimento anormal, com tamanho reduzido, exibem manchas amarelas e caem precocemente. Ao cortar o fruto (Figura 4b), é possível verificar internamente filetes alaranjados na columela a partir da região do pedúnculo, sementes abortadas (necrosadas) e o albedo (parte branca da casca) com espessura maior que a de um fruto sadio. Os sintomas podem aparecer de 6 a 12 meses após infecção. O suco das frutas doentes tem sabor

mais ácido, menos doce e mais amargo. (DA GRAÇA et al., 2016; DUAN et al., 2009; FUNDECITRUS, 2019)

Figura 4: Sintomas típicos do HLB. Em a) ramos e em b) frutos.



Fonte: (FUNDECITRUS, 2019).

Atualmente são empregadas medidas de controle do HLB em pomares citrícolas, como: a erradicação de plantas ornamentais nos municípios produtores de citros, em especial a murta ou dama da noite (*Murraya paniculata*) que favoreçam a cópula do inseto vetor; aplicação de defensivos, com a finalidade de contenção do inseto vetor, e após diagnóstico positivo de plantas cítricas, deve-se realizar a eliminação destas dos pomares. (DA GRAÇA et al., 2016; FUNDECITRUS, 2001)

A detecção das plantas infectadas com HLB, geralmente, é realizada de forma subjetiva, por meio de observações visuais de um ou mais ramos com folhas amareladas, porém estes sintomas podem ser confundidos com outras doenças como, por exemplo, a Gomose, a Clorose Variegada dos Citros (CVC), ou com alguns dos tipos de deficiência nutricional de

micronutrientes, como zinco, manganês, magnésio ou cobre. Todavia, devem-se considerar também os casos de plantas que estão infectadas, mas no período de incubação da bactéria, 6 a 12 meses, dificultando a detecção e o controle da contaminação na pomar (Bové & Barros, 2006; da Graça et al., 2016; Yamamoto et al., 2014).

Deste modo, utiliza-se de técnicas laboratoriais para os diagnóstico das diferentes doenças que acometem as pomars produtoras de citros, viabilizando o monitoramento da propagação das diferentes doenças, facilitando a implementação de medidas de manejo para contenção das mesmas.

1.4. Identificação e detecção de HLB em citros

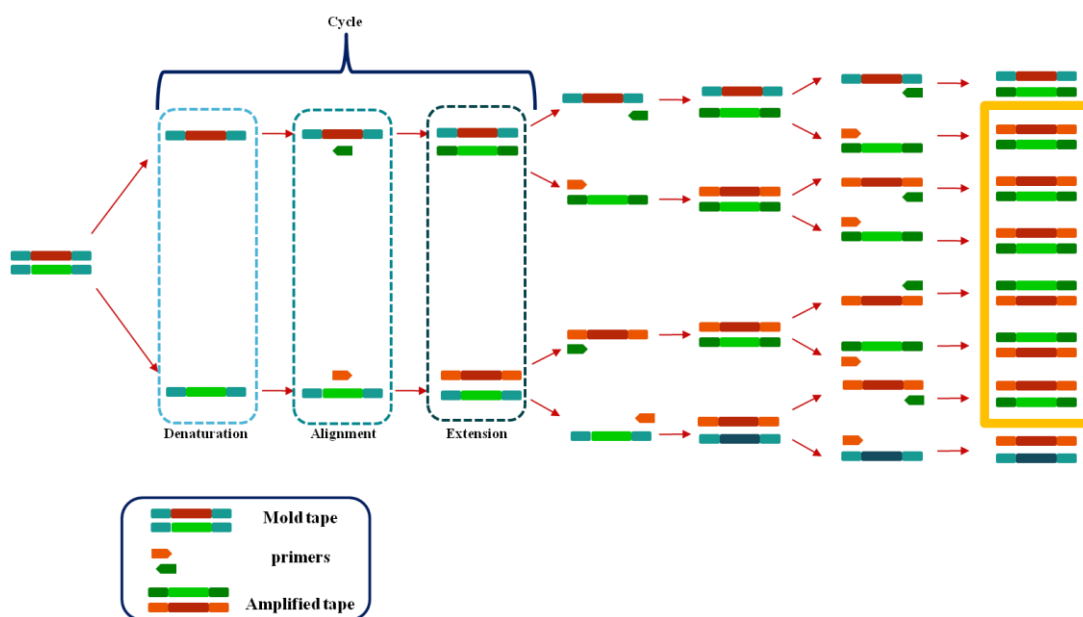
Com o desenvolvimento da biologia molecular e a manipulação de materiais biológicos a partir das ciências ômicas, permitiu-se o avanço de técnicas analíticas de caracterização e quantificação, promovendo o progresso no diagnóstico de doenças patogênicas associadas aos citros. Desta forma, as técnicas utilizadas como ‘padrão ouro’ no diagnóstico de doenças na citricultura são a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Ensaio Imunossorvente Ligado a Enzima - ELISA -do ingles “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

A PCR convencional foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983, que lhe valeu o prêmio Nobel de química em 1993. A PCR é uma técnica biomolecular que tem como princípio a geração de milhares a milhões de cópias de uma determinada sequência específica de DNA, partindo de um ou poucos segmentos desta sequência de origem. A reação ocorre em três etapas térmicas distintas de forma cíclica, as quais são desnaturação (94-98°C), alinhamento (50-65°C) e extensão (75°C).

A realização de PCR são necessários os seguintes componentes; 1) uma fita de DNA molde que contém uma sequência específica de DNA a ser amplificada (DNA alvo); 2) enzima Taq DNA polimerase, ou Taq polimerase (EC 2.7.7.7), oriunda de bactéria *Thermus aquaticus*, uma extremófila encontrada em fontes hidrotermais; 3) desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), utilizados como monômeros para construção da nova sequência de DNA gerada; 4) primers, que são sequências de DNA de fita simples, com 15 a 30 nucleotídeos, complementares a região 3’ da sequências alvo, os primers têm como função a sinalização da região inicial da sequência alvo a ser reconhecida pela enzima Taq polimerase; 5) solução tampão adequada para a atividade enzimática da Taq polimerase contendo íons bivalentes utilizados como cofatores enzimáticos, usualmente é utilizado Mg^{2+} . A cada ciclo sucessivo (Figura 5), a sequência alvo inicial mais todas as sequências recém geradas tornam-se modelo para o próximo ciclo de

alongamento, levando à amplificação exponencial da região específica do alvo de DNA. A fórmula usada para calcular o número de cópias de DNA formadas após um determinado número de ciclos é $N = N_0 \cdot 2^n$, em que N_0 Número inicial de DNA molde e n é o número de ciclos. Assim, um conjunto de reação para 30 ciclos, com N_0 igual a 1 resulta em 2^{40} , ou $1,0995 \times 10^{12}$ cópias da região original do alvo de cadeia dupla.

Figura 5: Ciclos térmicos realizados por PCR.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos de uma reação de PCR podem ser visualizados empregando técnica de separação eletroforética em gel de agarose e utilizando como corante o brometo de etídio, molécula orgânica intercaladora de dupla hélice das moléculas de DNA que apresenta fluorescência quando irradiada com luz ultravioleta (UV), possibilitando assim a visualização da banda de interesse.

Jagoueix et al. (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1996) descreveram o primeiro protocolo para distinguir *Liberobacter asiaticum* de *Liberobacter africanum* para o diagnóstico de HLB em amostras de laranja doce (*Citrus sinensis*) usando DNA ribossomal (rDNA).

Os autores utilizaram primers universais fD1 e rP112 para amplificação geral de 16S rDNA procariótico e iniciadores OI2c e OI1, definidos a partir das sequências 16S rDNA de *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. africanum*, os autores definiram 2 primers (OI2c e OI1) e um primer (OA1), respectivamente, para avaliação por PCR.

O par OI1/OI2c amplificou as duas espécies, enquanto o par OI2c/OA1 amplificou preferencialmente *L. africanum*. Portanto, este procedimento pode ser utilizado para o diagnóstico de HLB em plantas cítricas, independentemente das cepas de *Liberobacter* presentes na cultura. O trabalho de Jagoueix et al. (JAGOUeix; BOVÉ; GARNIER, 1996) forneceu um precedente para o uso de rDNA no diagnóstico de doenças dos citros, especialmente HBL.

Com o desenvolvimento da instrumentação laboratorial, foi desenvolvido uma nova forma de monitoramento em tempo real das medidas de PCR, a qPCR (PCR quantitativo) ou PCR em Tempo Real (RT-PCR). Nesta técnica há uma combinação da metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. (HEID et al., 1996; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2014; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008) A metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizadas em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação da amostra e possibilitando o desenvolvimento de método qualitativo e quantitativo para a detecção de sequências alvos de DNA. (HEID et al., 1996; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2014; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008)

Os métodos mais comuns de detecção no qPCR são o uso de corantes fluorescentes que se ligam a DNA de dupla fita, destaca-se como corante mais utilizado o SYBR Green I (SG), ou sondas hidrolisantes específicas a certas sequências de DNA, a mais empregada é a TaqMan. (RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2014; TAJADINI; PANJEHPUR; JAVANMARD, 2014; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008)

Os dados quantitativos de qPCR podem ser analisados de forma absoluta ou relativa. Na quantificação absoluta, o número total de cópias do produto do PCR é obtido após interpolação em curva padrão previamente estabelecida. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2014).

Para avaliação da quantificação relativa, o sinal da sequência de interesse é comparado com o de um sinal controle. Para este método, mede-se o valor de Ct, que é o número do ciclo em que o sinal de fluorescência emitido durante o qPCR atinge um limiar significativamente acima da fluorescência de fundo. Assim, menores valores de Ct indicam maiores níveis de expressão, pois são necessários menos ciclos de amplificação para atingir o limiar. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2014; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008) Assim, o diagnóstico laboratorial mais utilizado na detecção e

quantificação de HLB é o teste biomolecular de qPCR. (BOINA; BLOOMQUIST, 2015; DING et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2008b)

Morgan e colaboradores (MORGAN et al., 2012) descrevem em seu trabalho o uso de repetições intragênicas quase idênticas de genes de profagos para *Ca. L. asiaticus*, o gene LJ900, que foram monitorados utilizando qPCR por sonda TaqMan(®) e marcador SYBR Green. Os autores exibiram valores de Ct obtidos de 3,71 utilizando sonda TaqMan(®) e 9,88 para marcador SYBR Green. Desta forma foi possível detectar *Ca. L. asiaticus* a partir de amostras de psilídeos e diferentes variedades de plantas cítricas sugerindo novo método de detecção de HLB. (MORGAN et al., 2012)

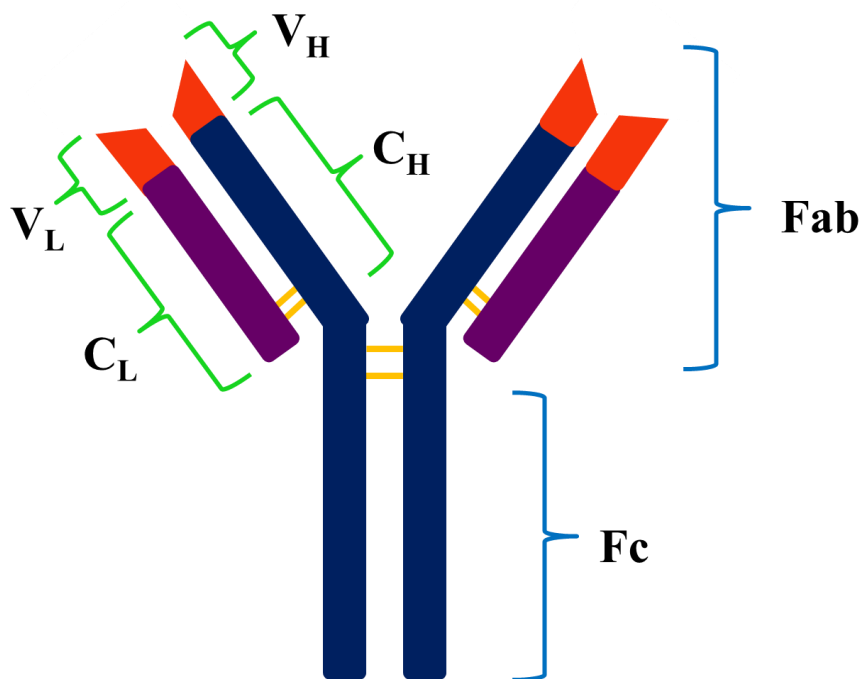
Morgan e colaboradores (WULFF et al., 2019) analisaram HLB em 226 amostras de citros oriundas de diferentes cidades do cinturão citrícula São Paulo e Minas Gerais. Dado o número total de amostras analisadas, podemos dizer que a incidência de amostras infectadas com fitoplasma 16SrIII é de 0,23%. Para efeito de comparação, *Ca. L. asiaticus* é detectado em uma média de 75,3% das amostras analisadas. Para tal avaliação empregou-se o par de primers Pint_fw_III e Pint_rv_III em sistema de detecção qPCR utilizando sonda TaqMan(®). (WULFF et al., 2019)

Outro método importante para o diagnóstico da doença dos citros é baseado na reação anticorpo-antígeno, a técnica de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). O teste ELISA foi desenvolvido por Peter Perlmann e Eva Engvall no ano de 1971 e baseado na interação antígeno-anticorpo (Ag-Ab) com a finalidade de quantificar um antígeno, molécula alvo, de interesse que pode ser um composto orgânico, um peptídeo, uma proteína, um vírus ou uma bactéria. (ENGVALL; JONSSON; PERLMANN, 1971; LINDENMANN, 1984; TAYLOR; SHI; BARR, 2011)

Os anticorpos (Ac) são glico-proteínas de conformação globulinas, imunoglobulinas (Ig) que apresentam em geral um peso molecular de ~150 kDa. Existem diferentes tipos de anticorpos, chamados isótipos, diferenciados pela forma da cadeia pesada que apresentem que são: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada isótipo desempenha funções diferentes em mamíferos de onde são produzidos, contribuindo para dirigir a resposta imunitária conforme cada tipo de corpo estranho que encontram. (BOGUSZEWSKA et al., 2019; ENGVALL; JONSSON; PERLMANN, 1971; TAYLOR; SHI; BARR, 2011). Na Figura 6 está representada a Ig do tipo G (IgG). Estas globulinas são produzidas por linfócitos B e reagem de forma específica ao antígeno (Ag) que induziu a sua produção. Os Ac apresentam estrutura na forma “Y” e uma região constante pesada (Fc) e duas cadeias variáveis (Fab). São formados por duas cadeias

maiores (cadeias pesadas, H, “heavy”) e duas cadeias menores (cadeias leves, L, “light”), sendo duas regiões constantes C_H e C_L , e duas regiões variáveis V_H e V_L , as que são denominadas de paratopo, onde ocorre o bioreconhecimento do epítipo e formação do complexo Ag-Ac. A cadeia leve se liga à cadeia pesada por pontes dissulfeto. (LINDENMANN, 1984; LITMAN et al., 1993; TAYLOR; SHI; BARR, 2011)

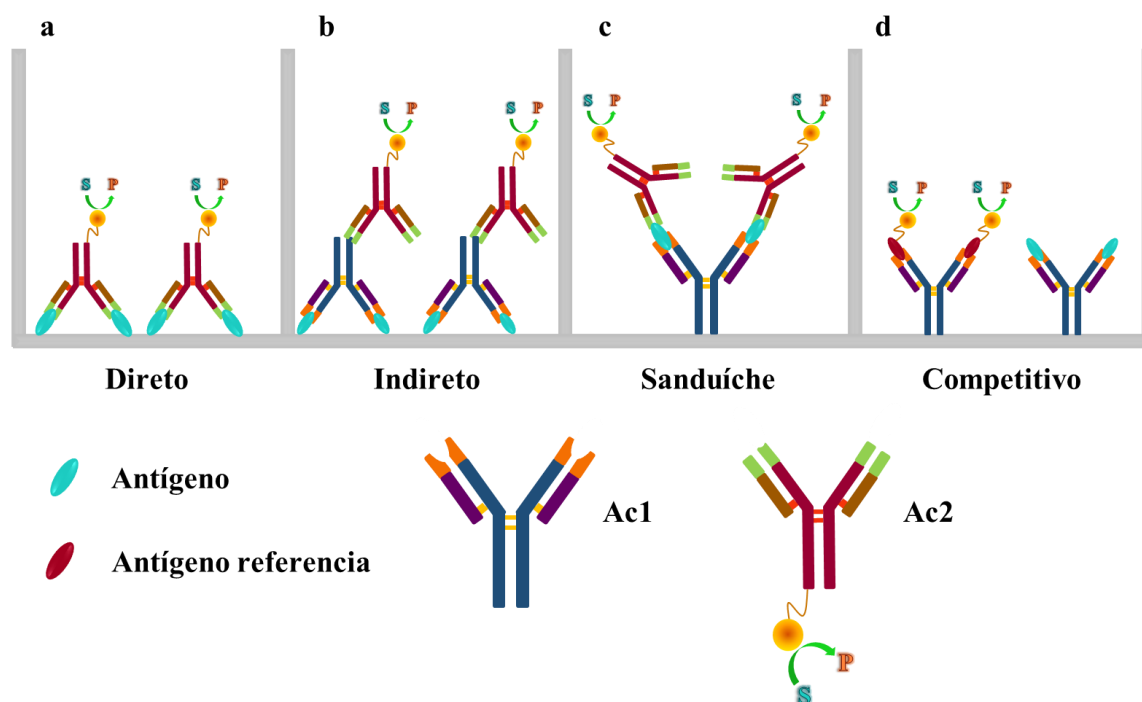
Figura 6: Representação de molécula de imunoglobulina IgG.



Fonte: Autoria própria.

Existem quatro tipos principais de ELISAs: direto, indireto, sanduíche e competitivo. Cada tipo é descrito abaixo com um diagrama que ilustra como os analitos e anticorpos são ligados e usados, Figura 7. As análises são realizadas em espectrofotômetro ou fluorímetro, a depender do tipo de marcação empregada. (BOGUSZEWSKA et al., 2019; TAYLOR; SHI; BARR, 2011)

Figura 7: Tipos de ELISA. a) direto; b) indireto; c) sanduíche e d) competitivo



Fonte: Autoria própria.

Diante de todos os problemas que o HLB tem causado na citricultura, Pagliaccia e colaboradores (PAGLIACCIA et al., 2017), usaram a proteína efetora SDE1 secretada por *Ca. L. asiaticus*, como marcador de detecção de árvores infectadas com HLB. Os autores inocularam e purificaram anticorpo policlonal a partir de soro de coelho por cromatografia de afinidade seguida da avaliação de sua afinidade para o reconhecimento do antígeno SDE1 por ELISA indireto. Proteínas SDE1 purificadas foram adicionadas a extratos saudáveis de floema de plantas de toranja (*Citrus × paradise*) e laranja doce (*Citrus × sinensis*). (PAGLIACCIA et al., 2017). Experimentos de ELISA indireto foram realizados com extratos proteicos de tecidos de árvores assintomáticas e sintomáticas, em ambos os casos das mesmas árvores sabidamente infectadas por *Ca. L. asiaticus*. Quatro árvores deram sinais positivos que foram estatisticamente significativos ($p < 0,001$), em comparação com o tecido saudável. As amostras assintomáticas testaram negativo por qPCR, provavelmente devido à ampla distribuição de SDE1, em comparação com células *Ca. L. asiaticus*, nos citros infectados analisados. Os autores demonstraram a viabilidade do uso de SDE1 como biomarcador para a detecção de HLB em extratos vegetais. (PAGLIACCIA et al., 2017)

O gene omp, codifica uma proteína de membrana externa (OMP), foi considerado o candidato mais promissor para estudar a variabilidade inter e intraespécies. Tal proteína

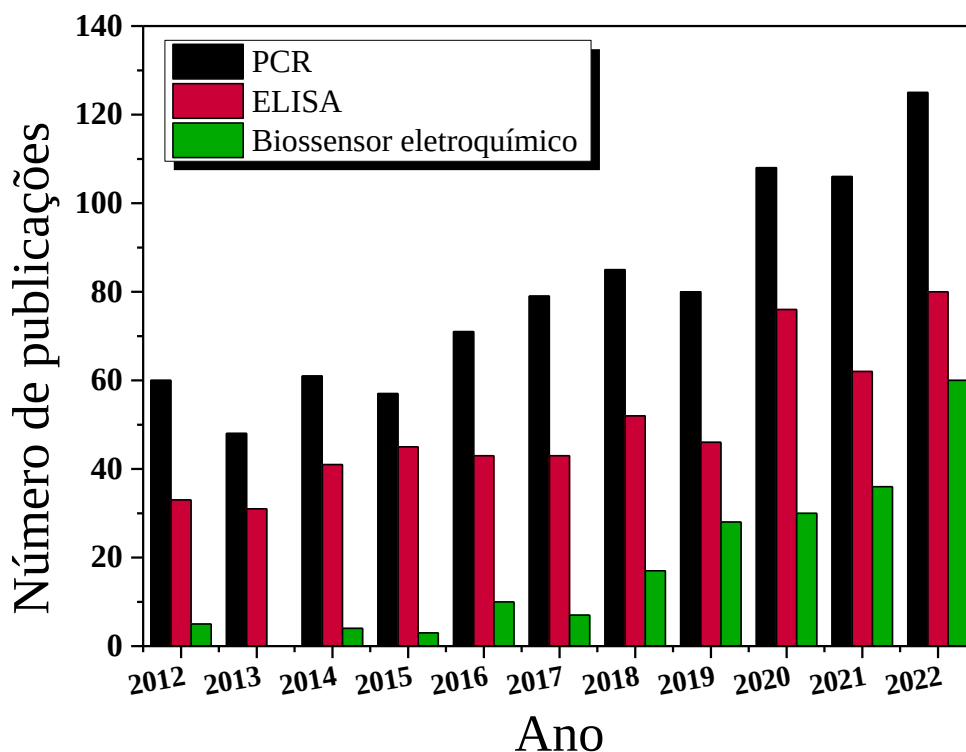
participa de trocas entre meio externo e interno, e em alguns casos, pode estar envolvida na patogenicidade do microorganismo, atuando assim como um antígeno na detecção de HLB em citros. No entanto, esse tipo de proteína possui uma estrutura muito complexa, dificultando sua expressão em *Escherichia coli*. (RUIZ; SILHAVY, 2005)

Lu e colaboradores, (LU et al., 2013) propuseram dois anticorpos policlonais para a proteína Omp com o auxílio de análises de bioinformática. Esses anticorpos Omp foram usados para detectar cepas de *Ca. L. asiaticus* em diferentes amostras de citros infectadas com diferentes patógenos e/ou deficiência nutricional, sintomas que levam à confusão na identificação do HLB no campo, assim possibilitando melhora nas abordagens atuais para diagnosticar o HLB. Os pesquisadores compararam a resposta obtida por ELISA indireto e PCR, na detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em amostras de citros. Foram avaliadas 481 amostras de diferentes espécies do gênero citros de 18 origens geográficas diferentes. Os anticorpos desenvolvidos por Lu e colaboradores foram capazes de detectar “*Ca. L. asiaticus*” em 45,7% das amostras sintomáticas avaliadas, e os resultados da detecção foram corroborados pelo ensaio de PCR, que detectou *Ca. L. asiaticus* em 56,2% das amostras sintomáticas. Assim, os autores propõem os anticorpos desenvolvidos como teste diagnóstico para HLB em amostras de extratos vegetais.

As técnicas biomoleculares empregadas no diagnóstico de HLB em citros, apesar de apresentarem baixos limites de detecção e dependendo das condições experimentais uma especificidade adequada, estas por sua vez requerem laboratórios equipados e mão de obra altamente qualificada, gerando um alto custo operacional para a cadeia citricultora.

Nesse sentido, novos métodos de diagnóstico como os biossensores podem ser uma opção viável, visto que são dispositivos muito sensíveis, com baixo custo de análise, permitindo miniaturização e uso em campo. Na Figura 8 são exibidos os números de publicações obtidos em uma busca no site Science Direct empregando as palavras-chave; " citrus diseases diagnostic PCR ", " citrus diseases diagnostic ELISA " e " citrus diseases diagnostic electrochemical biosensors " no período de 2012 a 2022.

Figura 8: Número de publicações exibidas em uma pesquisa no site Science Direct. Palavras-chave empregadas: "citrus diseases diagnostic PCR", "citrus diseases diagnostic ELISA" e "citrus diseases diagnostic electrochemical biosensors".



Fonte: Autoria própria.

A Figura 8 indica um número considerável de publicações (período 2012-2022) na plataforma envolvendo o diagnóstico de doenças em citros com predominância da utilização da técnica de PCR e crescente o número de publicações envolvendo biossensores eletroquímicos. Nesse caso, salta de 5 artigos em 2012 para 60 no ano de 2022.

Nesta tese desenvolveu-se um imunossensor impedimétrico para detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em citros. Resumidamente, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas que foram modificadas para imobilizar anticorpo anti proteína OMP. As amostras de folhas de citros, que se estiverem contaminadas contém o antígeno pep-OMP, foram devidamente preparadas, e colocadas em contato com o anticorpo imobilizado. Com auxílio de imã, as nanopartículas magnéticas são separadas da suspensão da amostra, lavadas adequadamente, colocadas sobre eletrodo de carbono vítreo contendo em seu interior o imã de neodímio para então efetuar as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.

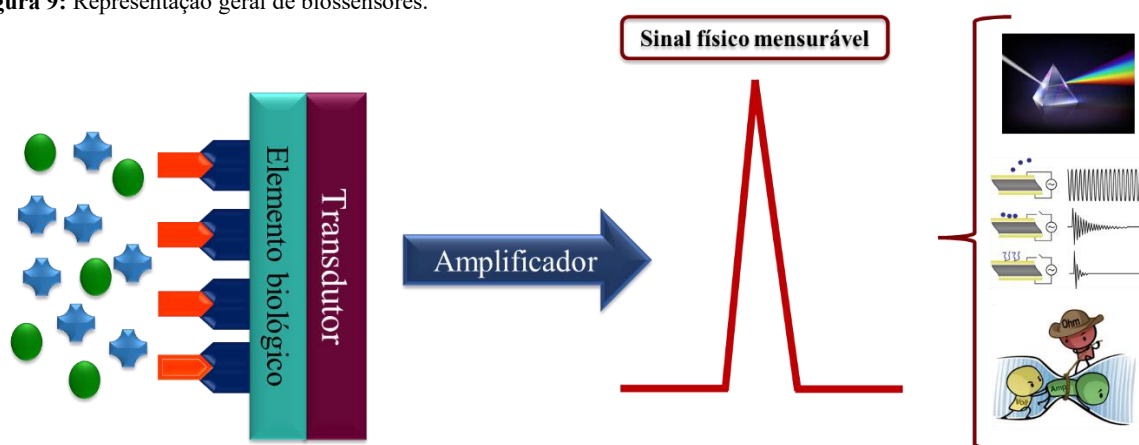
A seguir são apresentados conceitos importantes empregados no desenvolvimento do dispositivo.

1.5. Biossensores: definições e propriedade

A União Internacional de Química Pura e Aplicada “International Union of Pure and Applied Chemistry” - (IUPAC) define biossensores como dispositivos analíticos constituídos por um elemento de reconhecimento biológico, acoplado a um transdutor que transforma o sinal resultante da interação do analito com o elemento biológico em um sinal físico mensurável e um amplificador de sinal responsável pela leitura e processamento eletrônico da medição. Dependendo do analito, o elemento de reconhecimento pode ser uma enzima, um anticorpo, um antígeno, uma proteína, uma organela ou uma célula inteira, Figura 9. (HAMMOND et al., 2016; THÉVENOT et al., 2001)

Os biossensores podem ser classificados quanto ao transdutor utilizado, sendo mais comuns os ópticos que relacionam alterações do acoplamento de onda evanescente com os plásmons de superfície, piezelétricos que avaliam a variação de oscilação do cristal de quartzo com a massa adsorvida sobre ele e os eletroquímicos utilizam das propriedades elétricas da interface eletrodo/solução.

Figura 9: Representação geral de biossensores.



Fonte: Autoria própria.

O primeiro biossensor eletroquímico foi desenvolvido por Clark e Lyons em 1962 e era conhecido como eletrodo enzimático. (CLARK; LYONS, 1962) Esse biossensor utilizava a glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida, em eletrodos de Pt e detectava o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução. Assim, quantificou-se a variação da concentração de oxigênio dissolvido que, por sua vez, era proporcional à concentração de glicose. (CLARK; LYONS, 1962; UPDIKE; HICKS, 1967)

Estes dispositivos devem apresentar algumas características ideais, as quais estão destacadas na Tabela 2, no entanto, não há dispositivo que apresente máxima eficiência em todas estas características. Isso se dá devido as diferentes matrizes avaliadas, desta maneira cabe ao desenvolvedor a avaliação de qual destas características apresentam maior relevância na aplicação do biossensor desenvolvido.

Tabela 2: Características ideais de um biossensor.

Características	Definição
Sensibilidade	Um pequeno incremento na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido aferido.
Seletividade	Discriminação entre o analito e as demais espécies químicas presentes na amostra relacionadas, minimizando análises falso-positivos.
Reprodutibilidade	O dispositivo desenvolvido deve apresentar pequenas variações de sinal em relação as diferentes vezes que este foi preparado.
Precisão	O dispositivo deve exibir pequena variação de sinal entre as replicatas realizadas em uma mesma análise.
Robustez	O biossensor deve ser insensível às condições ambientais (temperatura, pH, interferências eletrônicas, e outros).
Tempo de análise	Análises rápidas, com respostas para o analito alvo em "tempo real".
Detecção de multianalitos	Um biossensor que possa detectar vários analitos simultaneamente, é altamente desejável.
Regeneração	A capacidade de regeneração da superfície de ligação, permitindo múltiplas medições pelo mesmo elemento é ideal.
Custo unitário e operacional	Baixo custo unitário e operacional para reagentes e outros materiais, permitindo uma aplicação mais ampla do sistema do dispositivo.
Tamanho e peso	Possibilidade de miniaturização.
Interface com o usuário	Idealmente, são desejados sistemas totalmente automatizados, ou que exigem pouco conhecimento e habilidades do operador

Fonte: (BHALLA et al., 2016; THÉVENOT et al., 2001)

Os principais campos de aplicação dos biossensores são: diagnóstico de doenças (BRAZACA et al., 2020; RAVALLI et al., 2015; SANTOS; BUENO; DAVIS, 2018; TRICOLI; NERI, 2018), segurança alimentar (FOGUEL et al., 2016; MOHAMMAD DANESH et al., 2016; ZHANG et al., 2021, 2020), monitoramento ambiental (FURST; HOEPKER; FRANCIS, 2017; KUMAR; KUMARI; SHARMA, 2020; LEONARDO; TOLDRÀ; CAMPÀS, 2021; YANG et al., 2015) e agricultura (COPPEDE et al., 2017; FREITAS et al., 2019a; KRIVITSKY et al., 2021; ZHAO et al., 2020)

Entre os diversos tipos de biossensores eletroquímicos, os imunossensores constituem uma categoria de dispositivos que dispõe de uma atenção especial, pois estes apresentam eficiência adequada em basicamente todas as características dispostas na Tabela 2, devido à grande afinidade da interação antígeno-anticorpo, tornando-se possível o desenvolvimento de

sensores bastante seletivos com aplicações em diferentes matrizes. (BARHOUM; J. FORSTER, 2022; BOFFADOSSI et al., 2020; MARTINS et al., 2021; OU et al., 2023; REGIART et al., 2020)

Por definição, um imunossensor é um dispositivo sensorial constituído por um anticorpo ou antígeno acoplado a superfície de um transdutor físico, o qual converte o sinal biológico de imunoafinidade em um sinal físico mensurável. (FELIX; ANGNES, 2018; YAMANAKA et al., 2009) A imobilização e organização de anticorpos sobre a superfície dos eletrodos pode ser realizada por vias distintas, sendo estas não covalente ou covalente.

A via não covalente utiliza de características inerentes dos anticorpos e/ou da superfície a qual estes irão ser acoplados. Desta forma, ocorre a adsorção de forma aleatória dos anticorpos sobre a superfície dos transdutores por meio de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio ou por forças de Van der Waals. (FELIX; ANGNES, 2018). A utilização desta via para o desenvolvimento de um imunossensor tem como vantagem a reprodutibilidade e simplicidade do método de imobilização, possibilitando a realização da fabricação em série dos dispositivos e a preservação da atividade e seletividade da biomolécula. (FELIX; ANGNES, 2018; GAO; GUIÁN; ROCHA-MARTIN, 2022; YAMANAKA et al., 2009)

Estes tipos de interações são reversíveis e podem ser facilmente alteradas pela mudança da temperatura, força iônica do meio ou pH. Assim, favorecendo a renovação da superfície transdutora, possibilitando a reutilização da mesma e diminuindo os custos no desenvolvimento do dispositivo. Todavia, o excesso de material biológico depositado pode formar múltiplas camadas e bloquear a superfície do transdutor, atuando como uma membrana difusional. (FELIX; ANGNES, 2018; GAO; GUIÁN; ROCHA-MARTIN, 2022; YAMANAKA et al., 2009)

Outra desvantagem da utilização de imobilizações não covalente é que no caso dos anticorpos, a porção Fab não se encontra organizada de forma que ocorra a máxima eficiência no reconhecimento do antígeno, diminuindo a sensibilidade e detectabilidade do imunossensor.

Em virtude disto, pode-se utilizar Proteína A de *Staphylococcus aureus* e/ou Proteína G de *Streptococcus* como direcionadores na imobilização dos anticorpos, devido à sua capacidade de adsorver seletivamente a região Fc dos anticorpos entre os domínios CH₂ e CH₃ e não interferir na especificidade da biomolécula pelo antígeno após o processo de adsorção. (GAO; GUIÁN; ROCHA-MARTIN, 2022; PRIETO-SIMÓN; SAINT; VOELCKER, 2014; YAMANAKA et al., 2009)

A construção de imunossensores via imobilização covalente pode ser realizada de diferentes maneiras. Uma destas maneiras é a formação de monocamadas auto-organizadas, do inglês “self-assembled monolayers” – SAM. Estas podem ser construídas pela da afinidade inerentemente forte em grupos tióis por Au, Au-SH, utilizando como ligantes moléculas orgânicas bifuncionais (HS-R-NH₂, HS-R-COOH) altamente organizadas sobre a superfície do eletrodo. (FELIX; ANGNES, 2018; GAO; GUISÁN; ROCHA-MARTIN, 2022; YAMANAKA et al., 2009)

Porém, a formação de SAM não é restrita apenas a superfícies de Au, é possível realizar este tipo de modificação sobre superfícies de carbono, possibilitado a construção destas estruturas pela formação de uma ligação covalente entre molécula de diaminoalcano (NH₂-(C_nH_{2n+2})-NH₂) e o carbono por meio de uma eletrooxidação. (GAO; GUISÁN; ROCHA-MARTIN, 2022; PRIETO-SIMÓN; SAINT; VOELCKER, 2014)

Outra maneira de construção de inunossensores eletroquímicos é a utilização de nanomateriais como plataforma para a imobilização de forma covalente sobre a superfície dos eletrodos. A nanotecnologia é um assunto em pleno desenvolvimento e refere-se à ciência e tecnologia de projetar, construir, manipular e entender materiais e sistemas em nanoescala (variação de tamanho de aproximadamente 1 a 100 nm), o que levou a muitas aplicações abrangentes em uma miríade de áreas, como na saúde, meio ambiente, energia e agricultura (LV et al., 2018; MARQUIÉ, 2001; NAGARAJAN; HATTON, 2008).

Os nanomateriais têm recebido destaque nos avanços tecnológicos devido às suas características físico-químicas únicas, as quais são geralmente diferentes daqueles presentes no material de mesma composição química e com dimensões maiores (bulk), tais como ponto de fusão, condutividade elétrica e térmica, magnetização, atividade catalítica, absorção e espalhamento de luz, etc. (JEEVANANDAM et al., 2018; KLABUNDE; RICHARDS, 2001) Estas propriedades únicas dependem das dimensões, formas e extensão da superfície dos nanomateriais e são produzidas pela elevada relação área/volume (energia de Gibbs de superfície), defeitos superficiais e efeitos quânticos presentes nos nanomateriais. (JEEVANANDAM et al., 2018; NAGARAJAN; HATTON, 2008)

O estudo das propriedades que emergem da nanoescala é conhecido como nanociência. O termo nanotecnologia se relaciona com o uso do conhecimento científico para a fabricação de dispositivos funcionais com base na montagem controlada de objetos em nanoescala para aplicações tecnológicas específicas. Os nanomateriais podem ser compostos de qualquer

substância, normalmente se classificam em 4 categorias: (JEEVANANDAM et al., 2018; NAGARAJAN; HATTON, 2008)

1) Nanomateriais a base de carbono: nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, grafeno e fulereno.

2) Nanomateriais compósitos ou híbridos: Materiais compostos por mais de uma fase, sendo necessariamente uma das fases com dimensões na escala nanométrica.

3) Nanomateriais orgânicos: dendrímeros, lipossomas, micelas e nanopartículas poliméricas.

4) Nanomateriais inorgânicos: Metais e óxidos de metais na escala nanométrica, incluem nanopartículas de Ag, Au, Fe, TiO₂, ZnO, SiO₂, entre outros.

As nanopartículas são preparadas por diferentes métodos e podem utilizar processos em fases gasosa, líquida ou sólida. Métodos coloidais são baseados em processos de precipitação em soluções. Soluções de íons diferentes são misturadas em condições controladas de temperatura e pressão para formar precipitados insolúveis. (JEEVANANDAM et al., 2018; NAGARAJAN; HATTON, 2008)

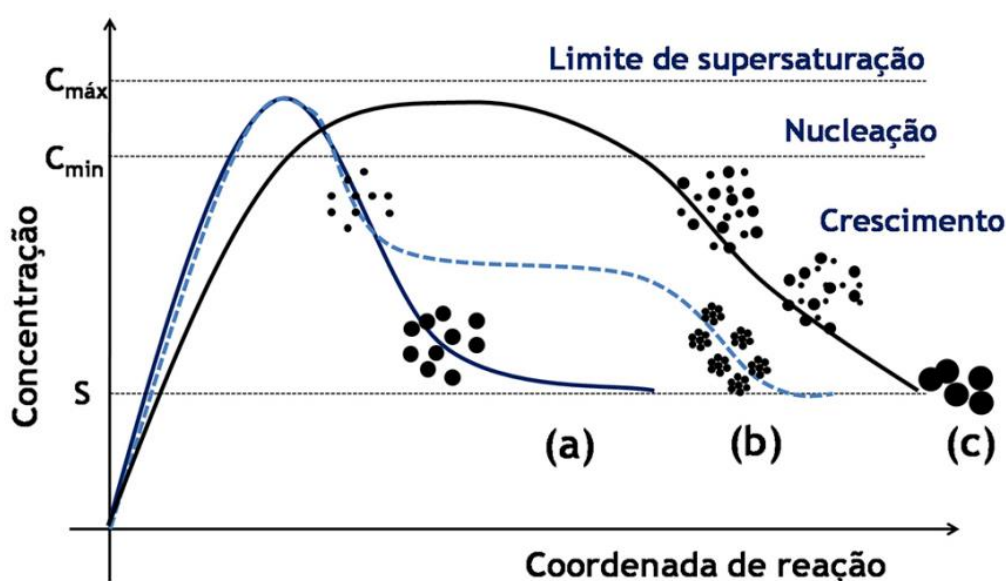
O desenvolvimento de biossensores baseados em nanomateriais, destacando-se as nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de ouro (AuNPs) (JONES et al., 2021; MANSURIYA; ALTINTAS, 2021) e as nanopartículas magnéticas (mNPs), aumentou a aplicabilidade de sistemas de diagnóstico na área. (ULIANA et al., 2019; VENTURINI ULIANA; YAMANAKA, 2020a)

As mNPs de óxido de ferro (Fe₃O₄) apresentam características superparamagnéticas, alta estabilidade e baixa toxicidade. (GUPTA; GUPTA, 2005) A síntese de nanopartículas de magnetita de óxido de ferro pode ser realizada de variadas maneiras, sendo os métodos mais comumente reportados na literatura a sonificação, (ABBAS; TAKAHASHI; KIM, 2013) o hidrotérmico, (TOGASHI et al., 2011) o poliol (SATHISH; BALAKUMAR, 2016) e a coprecipitação. (RAMIMOGHADAM; BAGHERI; HAMID, 2014)

O processo de coprecipitação a temperatura ambiente resulta na formação de sólidos (cristalinos ou amorfos), nos quais as propriedades físico-químicas estão diretamente ligadas aos parâmetros utilizados durante a síntese. (JEEVANANDAM et al., 2018; RAMIMOGHADAM; BAGHERI; HAMID, 2014) Os principais parâmetros são, razão molar e concentração dos metais; ordem e velocidade de adição dos reagentes; tipo de ânion; temperatura de precipitação e pH final da solução de precipitação.

É importante atentarmos que estas variáveis afetam significativamente o tamanho, morfologia, homogeneidade e comportamento magnético das partículas formadas. (JANASI et al., 2002; NAGARAJAN; HATTON, 2008) Em suma, o método de coprecipitação, segundo LaMer e Dinegar (LAMER; DINEGAR, 1950), divide-se em duas etapas principais: 1) a nucleação, no qual há a formação dos cristais induzido pela saturação de monômeros na solução e 2) a etapa de crescimento das partículas, Figura 10.

Figura 10: Mecanismo de formação de partículas em solução. Curva a) nucleação simples e crescimento uniforme por difusão explicado pelo modelo de LaMer e Dinegar; Curva b) nucleação, crescimento e agregação de subunidades e Curva c) evento de nucleação múltipla e amadurecimento de Ostwald.



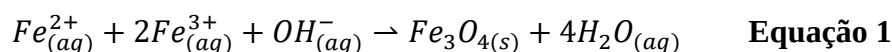
Fonte: (SOUSA FILHO; SERRA, 2015)

O método de coprecipitação tende a exibir as seguintes características: (i) os produtos das reações de precipitação são espécies geralmente pouco solúveis, formados sob condições de supersaturação, (ii) tais condições ditam que a nucleação será um passo-chave do processo de precipitação e que um grande número de pequenas partículas será formado. (iii) processos de crescimento de partículas maiores através da dissolução de partículas menores (amadurecimento de Ostwald) e a coalescência (agregação das partículas) vão afetar significativamente o tamanho, morfologia e propriedades dos produtos, (iv) as condições necessárias para induzir a precipitação são o resultado da interação dos parâmetros que influenciam a reação química, ditando as características finais do produto. (MURRAY; KAGAN; BAWENDI, 2000; VAYSSIÈRES et al., 1998)

A síntese das mNPs utilizando o método de coprecipitação é realizada com sais ferro (II) e ferro (III) que precipitam em meio alcalino formando a magnetita (Fe_3O_4). O controle de

tamanho, forma e composição das mMPs depende do tipo de sal utilizado (cloretos, sulfatos, nitratos), razão entre os íons de Ferro ($\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$), pH e velocidade de agitação. (RAMIMOGHADAM; BAGHERI; HAMID, 2014)

Convencionalmente, magnetita é preparada adicionando-se base a uma mistura aquosa de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} numa razão molar de 1:2, sob atmosfera inerte livre de O_2 , a temperatura ambiente ou a temperatura elevada. A obtenção de magnetita com alto grau de pureza é diretamente influenciada pela razão estequiométrica dos íons ferro e pH entre 9 e 14. (JEEVANANDAM et al., 2018; KIM et al., 2001; RAMIMOGHADAM; BAGHERI; HAMID, 2014) A fórmula da magnetita $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ (Fe_3O_4) mostra que são necessários 2 mols de íons Fe^{3+} para cada mol de íon Fe^{2+} , e a Equação 1 descreve o processo de formação:



Imediatamente após a adição da base, a coloração que antes era alaranjada torna-se escura, formando um precipitado negro. Casos nos quais a razão 1:2 de mols de íons ferro são mantidas, pode-se obter como produto da síntese duas fases distintas, como oxihidróxido férrico ($\text{FeO} \cdot \text{OH}$) e/ou goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$). A precipitação completa da magnetita ocorre em pH entre 8,5 e 10 em ambiente não oxidante. (JEEVANANDAM et al., 2018; JOLIVET, 1992; ZHANG et al., 2006)

Apesar da simplicidade de síntese da magnetita, esta não acontece em uma única etapa como descreve a Equação 1. Primeiramente ocorre a coordenação das moléculas de água (solvente) pelos cátions metálicos (M), formando espécies do tipo $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_x]^{n+}$ que sofrem hidrólise e formam compostos $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}]^{(n-1)+}$. (JANASI et al., 2002; JOLIVET, 1992; ZHANG et al., 2006). Estes compostos dimerizam com a liberação de água, obrigando os oxigênios dos grupos OH^- formarem pontes entre os metais ($-\text{OH}-$). Posteriormente, há uma associação entre as espécies hidrolisadas as quais se condensam por meio de pontes ol ($-\text{OH}-$) e oxo ($-\text{O}-$) em regiões ausentes de prótons, dando origem à estrutura do tipo espinélio, uma vez que tratamos de cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} (JANASI et al., 2002; JOLIVET, 1992; ZHANG et al., 2006). Os processos de nucleação e crescimento do cristal acontecem concomitantemente ao processo anterior, conhecido como condensação hidrolítica. A quantidade de partículas primárias de Fe_3O_4 formada relaciona-se com a taxa relativa de nucleação e crescimento. Para obter partículas com tamanho homogêneo é necessário que as etapas de nucleação e crescimento sejam separadas, de modo que a nucleação ocorra

primeiramente e só depois o crescimento. Na presença de oxigênio a magnetita pode sofrer oxidação e posteriormente ser transformada em maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), em condições de desidratação térmica a formação de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). (JANASI et al., 2002; JOLIVET, 1992; ZHANG et al., 2006)

Assim, os parâmetros como temperatura do meio reacional, pH, razão estequiométrica entre os íons Fe e controle da presença de O_2 no meio, influenciam na predominância das fases cristalinas dos produtos precipitados formados.

A superfície das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (mNPs) deve ser modificada com óxido de silício (SiO_2), também conhecido como sílica, consiste na formação de uma casca de sílica ao redor das mNPs obtendo nanopartículas com uma estrutura caroço-casca. Este tipo de modificação evita a agregação das nanopartículas, permite a estabilidade cinética coloidal em água, possibilitando a inserção de grupos químicos passíveis de ligação covalentes com biomoléculas, em especial anticorpos. (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; SAPSFORD et al., 2013)

A modificação de superfície de mNPs com sílica é realizada através do método sol-gel, o qual consiste na hidrólise controlada de alcóxidos, em uma solução de álcool em água e empregando um catalisador (usualmente hidróxido de amônio) para formar silanóis (Equação 2). Os oligômeros são formados na solução pela condensação dos silanóis (Equação 3). Os oligômeros reagem com os grupos hidroxila presentes na superfície das mNPs também por reações de condensação. Este processo permite inicialmente a formação de ligações covalentes entre a superfície das mNPs e a cadeia siloxano, e depois o crescimento da casca de sílica. (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007; SAPSFORD et al., 2013). Na Figura 11 está exibido um esquema de como esta modificação ocorre sobre a superfície das mNPs.

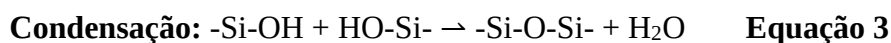
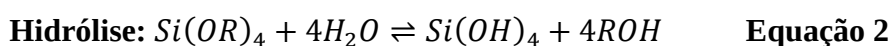
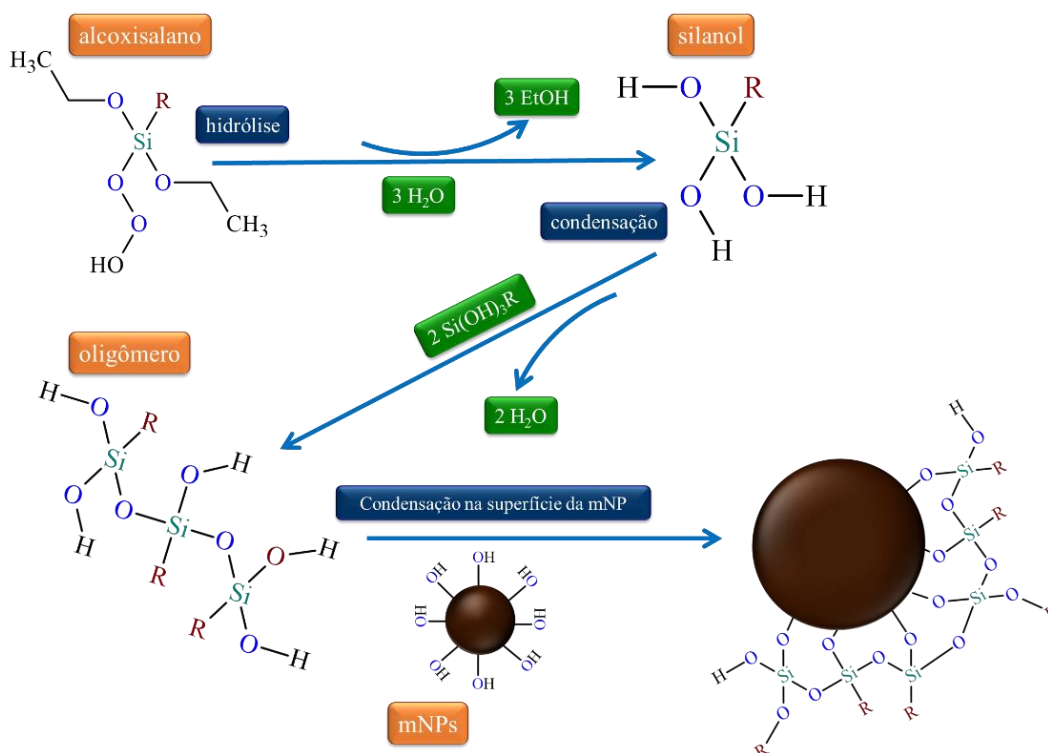


Figura 11: Esquema da modificação da superfície de mNPs com sílica empregando um alcoxisilano.



Fonte: Autoria própria.

A incorporação de sílica na superfície das mNPs produz um aumento no tamanho das nanopartículas que pode diminuir a estabilidade coloidal e a interação entre as nanopartículas e um campo magnético externo, pois a magnetização de saturação (M_s) é menor quando comparado com as mNPs sem modificação. Por isso é importante controlar a quantidade de sílica depositada na superfície das mNPs. A espessura da casca de sílica formada pelo método sol-gel é finamente ajustada através dos seguintes parâmetros: i) controle da concentração do alcoxisilano; ii) concentração do álcool; iii) concentração do catalisador (usualmente hidróxido de amônio); iv) tempo de reação e v) a temperatura da solução. (BITAR et al., 2018; GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2012)

A introdução de grupos funcionais na superfície das mNPs empregando alcoxisilanos acontece por duas vias distintas: a modificação da superfície das mNPs utilizando diretamente o alcoxisilano com o grupo funcional de interesse o qual produz a casca de sílica com os grupos funcionais livres na superfície das nanopartículas ou a formação previa de uma casca de sílica empregando TEOS para posteriormente modificar a superfície com o alcoxisilano que possui o grupo funcional de interesse. (BITAR et al., 2018; GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2012)

O primeiro método é mais simples e consome menor quantidade de reagentes, sendo possível a utilização de uma grande variedade de alcoxisilanos com grupos orgânicos funcionais distintos. Os alcoxisilanos com grupos funcionais mais populares são (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES, com grupo amina primária), (3-mercaptopropil)triétoxissilano (MPTEMS, com grupo tiol), 3-(trimetoxissilil)propil metacrilato (MPES, com o grupo metacrilato) e (3-glicidiloxipropil)trimetoxissilano (com o grupo epóxido). (BITAR et al., 2018; GHOSH CHAUDHURI; PARIA, 2012; SAPSFORD et al., 2013)

O APTES é o alcoxisilano mais empregado pois reagindo com uma molécula adequada pode deixar um novo grupo funcional na superfície, por exemplo a reação entre a amina primária e o anidrido succínico deixa grupos carboxila na superfície das nanopartículas, desta forma possibilitando a imobilização de anticorpos sobre a superfície deste tipo de nanomaterial permitindo o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos. (JOSELEVICH; WILLIAMS, 2008; SAPSFORD et al., 2013)

As mNPs permitem fácil aplicabilidade em sistemas de diagnóstico em campo, devido à minimização das etapas de preparo da amostra, pois quando aplicadas a um campo magnético externo, ficam aderidas à parede do frasco, favorecendo a remoção da fase líquida a ser descartada. Outra característica a ser destacada é que o uso de mNPs promove a pré-concentração do analito analisado, reduzindo o limite de detecção do procedimento aplicado.

Para a realização da ligação covalente entre anticorpo e grupamentos aminos presentes na superfície de mNPs modificadas com APTES é utilizando a molécula de glutaraldeído (glut) para tal etapa. (FELIX; ANGNES, 2018) A molécula de glutaraldeído é um dialdeído saturado que apresenta caráter bifuncional, possibilitando a ligação em um dos grupos carbonila ao grupo amino primário da extremidade na mNP modificada com APTES enquanto o outro permanece livre no topo da superfície para ligação com os grupos aminos primários presentes nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácido que constituem o anticorpo. (GAO; GUISÁN; ROCHA-MARTIN, 2022; HERMANSON, 2013; PRIETO-SIMÓN; SAINT; VOELCKER, 2014)

Esta reação é denominada como *Base de Schiff*, em que há formação de uma imina devido à adição nucleofílica de grupo amino primário ($R-NH_2$) presente na superfície do eletrodo e a carbonila ($R-CHO$) presente no glutaraldeído. A *Base de Schiff* é produzida em uma reação reversível, catalisada por ácido, que se inicia com a adição nucleofílica da amina primária ao grupo carbonílico, seguido de transferência de um próton do nitrogênio para o oxigênio, formando uma carbinolamina, intermediário tetraédrico inicialmente formado. A protonação do oxigênio da carbinolamina pelo catalisador ácido promove então a perda de uma

molécula de água, que produz um íon imínico por meio da perda de um próton do nitrogênio formando o produto final $R_1R_2C=N-R_3$. (HERMANSON, 2013; KUZNETSOVA et al., 2013; MARQUIÉ, 2001; OLDE DAMINK et al., 1995)

A literatura relata diversos trabalhos utilizando a imobilização covalente de anticorpos no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, esta via de imobilização apresenta como desvantagem a diminuição da atividade biológica dos anticorpos, entretanto, exibe como vantagem o direcionamento na molécula biológica sobre a superfície do transdutor, favorecendo a sensibilidade e detectabilidade do dispositivo, bem como proporcionando, um aumento no tempo de vida do biossensor. (GAO; GUISÁN; ROCHA-MARTIN, 2022; PRIETO-SIMÓN; SAINT; VOELCKER, 2014; YAMANAKA et al., 2009)

Em relação à forma de monitoramento do sinal avaliado, os imunossensores eletroquímicos podem ser classificados em dois tipos, sendo indiretos ou diretos. (LI; YANG; ZHANG, 2008; SYAHIR et al., 2015; YAMANAKA et al., 2009) Os imunossensores indiretos medem o resultado desta interação em relação à alteração de um determinado marcador eletroquimicamente ativo, por esta razão, há diversos agentes marcadores utilizados. Estes agentes podem ser enzimas, íons metálicos e outros compostos eletroativos. Esse tipo de imunossensor pode ser denominado também de “label-based”. (LI; YANG; ZHANG, 2008; MISTRY et al., 2014; YAMANAKA et al., 2009)

Já os imunossensores diretos possibilitam o monitoramento da formação do imunocomplexo Ag-Ac propriamente dito, ou seja, são capazes de detectar uma mudança física durante a interação do anticorpo com o antígeno, também denominados de “label-free”, pois não lançam mão do uso de uma molécula marcadora. (LI; YANG; ZHANG, 2008; SYAHIR et al., 2015; YAMANAKA et al., 2009)

A formação do imunocomplexo ocasiona alterações nas propriedades eletroquímicas da interface eletrodo/solução na superfície do eletrodo de trabalho, desta maneira as alterações de alguma destas propriedades é a base dos imunossensores livre de marcadores.

Para mensuração destas alterações utiliza-se a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), “Electrochemical Impedance Spectroscopy” (EIE), a qual é uma ferramenta empregada para medidas não destrutivas da superfície do eletrodo de trabalho, possibilitado a avaliação de processos faradaicos e não-faradaicos na interface eletrodo/solução.

O uso da EIE possibilita desenvolver imunossensores livre de marcadores, já que a formação do imunocomplexo (Ag-Ac) acarreta uma mudança na resposta do sistema comparada a etapa anterior à reação de imunoafinidade. Este fato implica em maior

simplicidade e menor custo pelo uso do biossensor, uma vez que o ensaio necessitará de um menor número de etapas e dispensará a utilização de anticorpos secundários marcados. (GRIESHABER et al., 2008; LISDAT; SCHÄFER, 2008a; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008).

1.6. Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica que fornece uma informação plena e minuciosa das características eletroquímicas de uma interface eletrodo/solução quando muitos elementos de resposta estão envolvidos em diferentes velocidades. De maneira geral, a EIE é uma técnica de estado estacionário, isto é, quando o sistema eletroquímico não se altera com o tempo. A EIE é uma técnica amplamente difundida, de grande interesse e utilidade na área da eletroquímica e eletroanalítica e tem grande sensibilidade para medição dos eventos elétricos complexos de uma interface eletrodo/solução. (LISDAT; SCHÄFER, 2008b; MACDONALD, 2006; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

O conceito de impedância elétrica é datado no século XIX, quando Oliver Heaviside, matemático e engenheiro eletricitista inglês, descreveu equações integrais/diferenciais para avaliar a influência de uma corrente elétrica em um sistema de corrente alternada “alternating current” - (AC), quando esta, percorre através de um circuito elétrico na presença e/ou ausência de diferentes componentes elétricos (resistores, capacitores e indutores), Equação 4. (HEAVISIDE, 2011; MACDONALD, 2006)

$$\tilde{Z}(s) = \frac{\tilde{E}(s)}{\tilde{I}(s)} \quad \text{Equação 4}$$

A princípio a impedância era caracterizada apenas em sistemas discretos e arbitrariamente distribuídos, sendo representada pela transformada de Fourier da equação diferencial, Equação 5, descompondo o sinal elétrico mensurado em função da frequência angular (ω). Nessa equação Z é a impedância total em função do operador imaginário (j) e de ω , E é o potencial elétrico e I a corrente elétrica, ambas em função do tempo (t), enquanto F é o operador de Fourier. (MACDONALD, 2006; MACDONALD; JOHNSON, 2018)

$$Z(j\omega) = \frac{F[E(t)]}{F[I(s)]} \quad \text{Equação 5}$$

A equação diferencial citada acima apresenta um problema, pois ela reduz a expressão apenas a simples 1ª lei de Ohm, o que torna a impedância apenas uma resistência simples. No

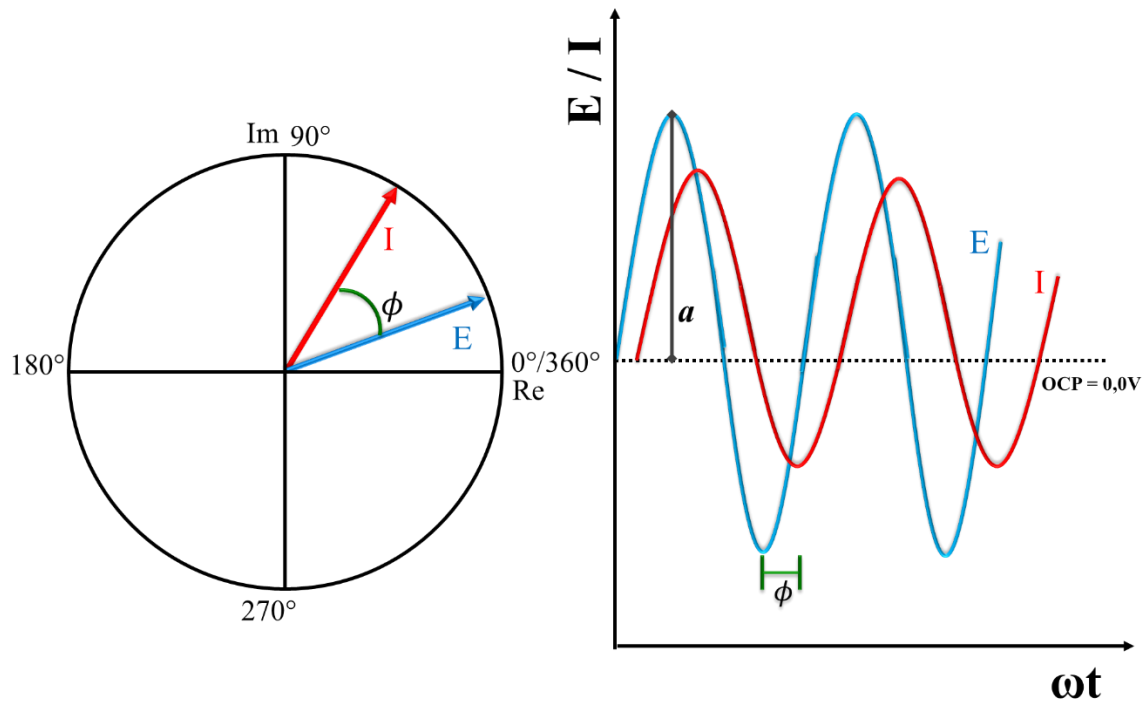
entanto na década de 1880, com o advento da representação de números complexos utilizando diagrama de vetores, Heaviside elaborou um novo modelo matemático que permitiu simplificar as expressões complexas geradas através dos tratamentos das respostas de corrente elétrica em simples expressões algébricas. (MACDONALD, 2006; MACDONALD; JOHNSON, 2018)

Fundamentalmente Heaviside se valeu de uma associação entre as transformadas de Fourier (no domínio do tempo) e La Place (domínio da frequência) para relacionar I e V no domínio da frequência. (MACDONALD, 2006; MACDONALD; JOHNSON, 2018)

Desta forma, ele determinou dois operadores para o valor de s , para $s = \frac{d}{dt}$ e $\frac{1}{s} = \int dt$, relacionando o termo s com a frequência de Laplace, isto é, para cada valor específico de aplicação de potencial há uma resposta específica de corrente e conseqüentemente uma resposta final de impedância, que varia com o tempo, nesse caso com a frequência, Equação 6. (HEAVISIDE, 2011; MACDONALD, 2006; MACDONALD; JOHNSON, 2018)

$$F(s) = \mathcal{L}\{f(t)\} = \int_0^{\infty} e^{-st} f(t) dt \quad \text{Equação 6}$$

Assim, a impedância é, portanto, uma função transferência entre o $E(t)$ e $I(t)$, Equações 7 e 8 respectivamente, que se comportam como uma onda senoidal em um sistema de AC. A partir disto foi possível relacionar E e I como fasores em um plano complexo, como exibido na Figura 12. (HEAVISIDE, 2011; MACDONALD; JOHNSON, 2018; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

Figura 12: Representação esquemática dos fasores E e I.

Fonte: Autoria própria.

$$E(\omega, t) = E_0 \sin \omega t \quad \text{Equação 7}$$

$$I(\omega, t) = I_0 \sin(\omega t + \phi) \quad \text{Equação 8}$$

Logo;

$$Z(\omega, t) = \frac{E(\omega, t)}{I(\omega, t)} = Z_0 \frac{\sin \omega t}{\sin(\omega t + \phi)} \quad \text{Equação 9}$$

É importante ressaltar que, na EIE a perturbação de potencial é executada por um sinal do tipo senoidal de pequena amplitude (a) em torno do valor de E^0 da interface eletrodo/solução, este potencial é denominado de potencial de circuito aberto, “Open Circuit Potential” (OCP).

O OCP é o potencial no qual não há passagem de corrente; ou seja, é valor de E entre os eletrodos de trabalho e eletrodo de referência quando nenhuma corrente elétrica flui dentro do circuito. Neste ponto, é importante destacar que, a medida de EIE é feita com o sistema em estado de equilíbrio e não fora dele como a maioria das técnicas eletroquímicas fazem. Assim, o princípio da EIE consiste na aplicação de uma pequena diferença de potencial (5 a 20 mV) no sistema, gerando uma corrente elétrica alternada. A frequência utilizada na técnica, normalmente varia em uma faixa de 10 mHz a 100 kHz. (BARD; FAULKNER, 2000; BENAVENTE, 2005; BREDAR et al., 2020)

Então, a partir da aplicação de uma pequena perturbação de potencial ou de corrente sobre o sistema, a resposta de corrente ou potencial que surge pode estar completamente em fase, completamente fora de fase ou em ângulos intermediários (ϕ – ângulo de fase) em relação à outra função. (LISDAT; SCHÄFER, 2008b; MACDONALD; JOHNSON, 2018; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

Levando em consideração a relação de Euler, dada pela Equação 10, é possível obter a Equação 11, onde $i = \sqrt{-1}$.

$$e^{i\phi} = \cos \phi + i \sin \phi \quad \text{Equação 10}$$

$$Z(\omega, t) = Z_0 e^{\cos \phi + i \sin \phi} \quad \text{Equação 11}$$

Desta forma, uma função deste tipo pode ser representada geometricamente em um plano complexo, que por sua vez, é desmembrado em um componente real (Z') no eixo das abcissas e um componente imaginário ($-Z''$) no eixo das ordenadas, Equação 12. (HEAVISIDE, 2011; MACDONALD; JOHNSON, 2018; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

$$Z = Z' + iZ'' \quad \text{Equação 12}$$

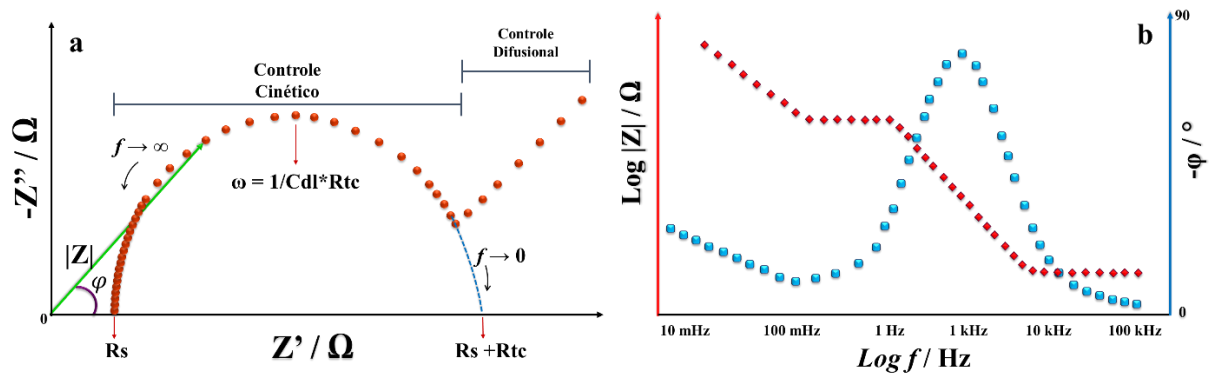
$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (Z'')^2} \quad \text{Equação 13}$$

$$\phi = \tan^{-1} \left(\frac{Z'}{iZ''} \right) \quad \text{Equação 14}$$

Assim Heavside, encontrou uma forma para representar a impedância em função da frequência, em que Z' é a impedância real associada aos valores de resistência eletroquímica do sistema, enquanto iZ'' corresponde à componente de impedância imaginária correlacionada a reatância capacitiva e/ou indutiva do sistema eletroquímico. (HEAVISIDE, 2011; MACDONALD; JOHNSON, 2018; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

A partir destas equações é possível realizar dois tipos de representações gráficas dos valores de Z obtidos em cada valor de ω avaliado, sendo o chamado diagrama de Nyquist ou no Plano Complexo, Figura 13a e o diagrama de Bode, Figura 13b.

Figura 13: Curvas e esquemas característicos da impedância eletroquímica. Em (a) Diagrama de Nyquist ou plano complexo e em (b) Diagrama de Bode.



Fonte: Autoria própria.

No diagrama de Nyquist, a impedância total do sistema, $|Z|$, é representada através da plotagem de seu componente imaginário $-Z''$ versus seu componente real Z' . Um diagrama de Nyquist típico apresenta um semicírculo na região de altas frequências e uma variação linear em médias e baixas frequências. O diagrama de Bode representa os dados obtidos com a EIE a partir da plotagem de $\log|Z|$ (sendo $|Z|$, o módulo da impedância) e o ângulo de fase ϕ , versus o $\log$ de ω ou $\log$ de f , sendo $\omega = 2\pi f$. As informações obtidas a partir destes gráficos podem ser complementares às obtidas no diagrama de Nyquist. (BARD; FAULKNER, 2000; BENAVENTE, 2005; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

Os parâmetros de um espectro de frequência em um sistema eletroquímico se dividem essencialmente em dois grupos: 1) os parâmetros intrínsecos ao material como, condutividade, constante dielétrica, mobilidade de carga e 2) os parâmetros relacionados à interface eletrodo/solução os quais destacam-se, capacitância da região interfacial, os aspectos termodinâmicos, a cinética das reações interfaciais e os efeitos de transporte de massa na interface de trabalho. (AGUEDO et al., 2020; BENAVENTE, 2005)

Devido à técnica de EIE mensurar o valor de Z em diferentes frequências de perturbação a uma amplitude fixa, é possível avaliar os mais diferentes processos redox na interface de trabalho, os quais podem ser associados a elementos de um circuito elétrico equivalente (CCE)". É importante salientar que a impedância deve ser obtida para o circuito fechado completo (loop) do sistema sob medida e não apenas para as propriedades da amostra. (CIUCCI, 2019; PUPIM FERREIRA et al., 2010; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; SANTOS, 2014)

O EEC utiliza de elementos que podem ser resistores, capacitores e indutores, que são associados aos processos eletroquímicos na interface eletrodo/solução, simulando, a partir desse circuito, o efeito de cada componente na resposta de corrente obtida. (CIUCCI, 2019; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

Um circuito elétrico equivalente muito utilizado é o Circuito de Randles, que é um modelo bastante conhecido para representar as equações cinéticas que levam as funções de impedância, exibidas na Figura 13. Um circuito elétrico equivalente engloba alguns termos resistência da solução eletrolítica, resistência de transferência de carga, capacitância da dupla camada elétrica e impedância de Warburg, que servem para descrever o efeito de cada componente elétrico. (CIUCCI, 2019; LASIA, 2014; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008)

Em um sistema AC, a impedância de R é determinada por meio da Equação 12, a qual expressa que sua impedância é igual a sua própria resistência R, devido à onda senoidal de E e de I estarem em fase. Em um diagrama de Nyquist como da Figura 13a, pode ser observado dois tipos de resistores, a resistência da solução eletrolítica (R_s) e a resistência de transferência de carga (R_{tc}). (CIUCCI, 2019; LASIA, 2014; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

$$Z_R = R \quad \text{Equação 12}$$

A R_s é obtida pela primeira intersecção do semicírculo com o eixo Z' e tem relação com condutividade do meio, logo esta é dependente da concentração e da composição do eletrólito suporte utilizado, pois a condutância tem relação com a mobilidade iônica dos elementos que compõe o meio. (CIUCCI, 2019; LASIA, 2014; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

A R_{tc} é a resistência associada ao processo de transferência de carga (transferência de elétrons que ocorrem nos processos de óxido-redução) na interface entre o eletrodo de trabalho e a solução. Logo, o aumento ou diminuição no valor de R_{tc} , estará diretamente relacionado com a dificuldade ou facilidade com que a transferência eletrônica do analito acontece na interface. (CIUCCI, 2019; LASIA, 2014; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

O valor de R_{tc} é obtido pela segunda intersecção do semicírculo com o eixo Z' , Figura 13a e seu valor é descrito aplicando a Equação 13, a qual provem da equação de Butler-Volmer. Ela depende dos seguintes parâmetros: constante de Faraday (F)

96485,33289 Cmol⁻¹; constante dos gases (R) 8,3144621 J K⁻¹ mol⁻¹; temperatura absoluta (T) 298,15 K, número de moles elétrons por mol de substância (n) e a corrente de troca eletrônica I_0 dada em A. (BARD; FAULKNER, 2001a; CIUCCI, 2019; LASIA, 2014)

$$R_{tc} = \frac{RT}{nFI_0} \quad \text{Equação 13}$$

$$I_0 = nFAK_0C_\infty \quad \text{Equação 14}$$

A equação de Butler-Volmer que assume que as concentrações da sonda redox na interface eletrodo/solução é igual à concentração no seio da solução. Assim, no E^0 é possível mensurar a corrente de troca I_0 , Equação 14, valor de I em que há ausência de eletrólise líquida, ou seja, a velocidade da reação de oxidação e redução são iguais, possibilitando avaliar a taxa de transferência eletrônica (k^0) em m s⁻¹ na interface de trabalho. A I_0 apresenta dependência de F , n , da área do eletrodo (m²) e da concentração do analito no seio da solução (C_∞) em mol L⁻¹. (BARD; FAULKNER, 2001b, 2001a)

Outro parâmetro importante que pode ser avaliado é a capacitância da dupla camada eletroquímica (C_{dl}). A C_{dl} se origina quando um potencial elétrico é aplicado no eletrodo de trabalho e íons (com cargas opostas ao eletrodo) se aproximam da superfície, formando a dupla camada elétrica. Esta aproximação é dependente da hidrofobicidade/hidrofiliicidade do material do eletrodo, dos íons que compõem o eletrólito e da força iônica do meio. (BURT; BIRKETT; ZHAO, 2014; HIRSCHORN et al., 2010; NETZ, 2004)

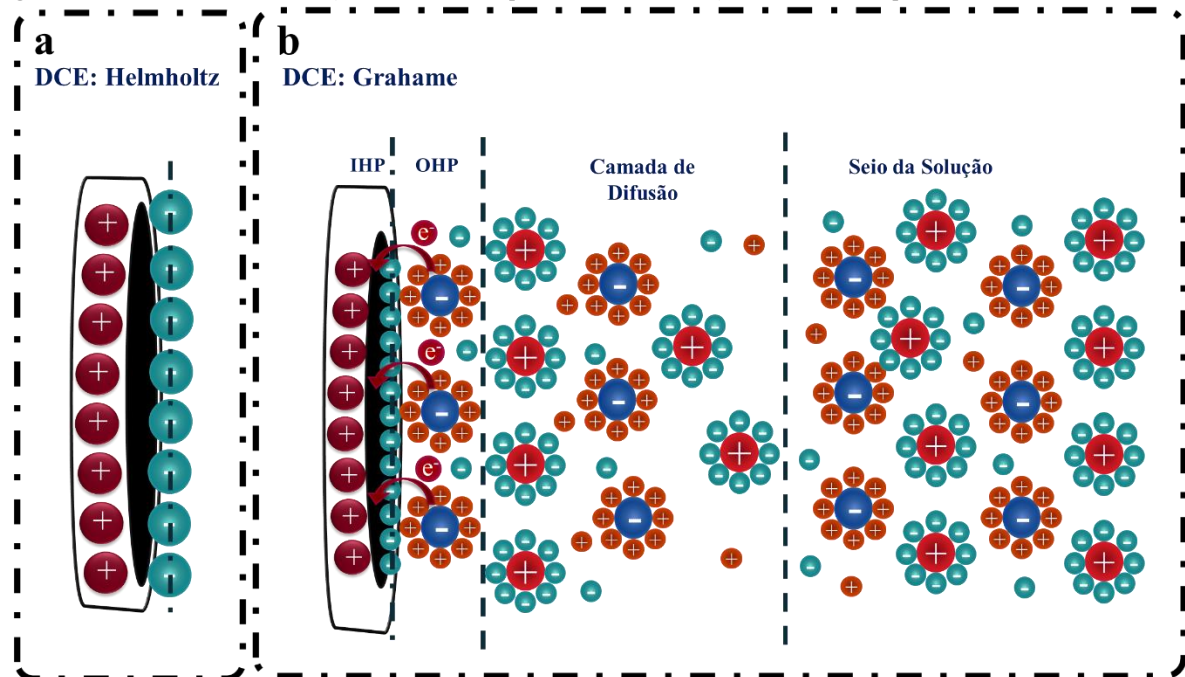
Assim, os modelos de dupla camada elétrica (DCE) foram inicialmente desenvolvidos usando soluções aquosas em interface com eletrodo metálico. O primeiro modelo foi desenvolvido por Helmholtz em 1853, e define a DCE como uma região contendo íons carregados na superfície de um eletrodo, que apresentam uma densidade de carga de sinal oposto à da superfície, separados por uma pequena distância de aproximadamente 1 nm. (BRETT; BRETT, 1993; BURT; BIRKETT; ZHAO, 2014; PILON; WANG; D'ENTREMONT, 2015)

Esse modelo é correspondido ao modelo de um capacitor de placas planas e paralelas, conforme Equação 15, em que C é a capacitância em farad (F), ϵ_0 é a constante de permissividade elétrica do vácuo (8,85 x 10⁻¹² C²/N m²), caso C não esteja em vácuo deve-se levar em consideração ϵ_r constante dielétrica intrínseca do meio. (BRETT; BRETT, 1993; BURT; BIRKETT; ZHAO, 2014; PILON; WANG; D'ENTREMONT, 2015)

$$C = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 A}{d} \quad \text{Equação 15}$$

Segundo Helmholtz o potencial da carga superficial é dissipado linearmente, a partir da superfície do eletrodo pelos íons com cargas opostas acumulados do lado da solução, Figura 14a. No entanto, esse modelo não considerava o movimento Browniano dos contra íons, negligenciando as interações que ocorrem além da primeira camada de íons adsorvidos e não levava em consideração a concentração do eletrólito. Outra limitação é a não dependência do acúmulo de cargas na interface com o potencial aplicado, pois para um capacitor de placas planas e paralelas a capacitância depende exclusivamente de fatores geométricos. (BRETT; BRETT, 1993; BURT; BIRKETT; ZHAO, 2014; PILON; WANG; D'ENTREMONT, 2015)

Figura 14: Modelos de DCE. Em a) modelo descrito por Helmholtz e em b) modelo descrito por Grahame.



Fonte: Autoria própria.

O modelo de DCE utilizado até os dias de hoje foi proposto pelo químico David C. Grahame em 1947. Grahame propõem que a DCE é composta por três regiões, sendo estas, o Plano interno de Helmholtz (IHP - do inglês “Inner Helmholtz Plane”), o plano externo de Helmholtz (OHP - do inglês “Outer Helmholtz Plane”) e uma terceira região difusa que está fora do OHP nomeada de Camada de difusão (Gouy-Chapman). Figura 14b. (BRETT; BRETT, 1993; BURT; BIRKETT; ZHAO, 2014; PILON; WANG; D'ENTREMONT, 2015)

A IHP é a região mais próxima à superfície do eletrodo na qual os íons são adsorvidos especificamente devido estes apresentarem densidade de carga de sinal oposto à superfície do eletrodo polarizado. Nesta região o potencial varia linearmente com a distância. (BRETT; BRETT, 1993; BURT; BIRKETT; ZHAO, 2014; NETZ, 2004; PILON; WANG; D'ENTREMONT, 2015)

A OHP consiste no plano imaginário, que passa pelo centro dos íons do eletrólito adsorvidos na superfície do eletrodo até o centro dos íons do início da camada de difusão. Esta região apresenta espécies hidratadas com cargas iguais a do eletrodo polarizado e o potencial varia linearmente com a distância. A camada de difusão é a camada mais externa da interface eletrodo/solução, sendo a região onde os íons do eletrólito estão dispersos desde o OHP até o seio da solução. (BRETT; BRETT, 1993; BURT; BIRKETT; ZHAO, 2014; PILON; WANG; D'ENTREMONT, 2015)

Isto posto, a forma com que os íons estão dispostos sobre a DCE, possibilita um melhor entendimento a respeito do transporte de cargas na interface de trabalho e como processos não-faradáicos participam na transferência eletrônica. Fisicamente este fenômeno pode ser descrito como um capacitor ideal de placas planas e paralelas, no entanto, devido às características morfológicas da superfície do eletrodo de trabalho, rugosidade ou propriedades das modificações sobre esta superfície, esse elemento capacitivo pode ser descrito por um elemento de fase constante ou CPE, do inglês “constant phase element”. (CIUCCI, 2019; HIRSCHORN et al., 2010; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; PAJKOSSY; JURCZAKOWSKI, 2017)

A impedância em um CPE ou também chamada de reatância capacitiva (Z_{CPE}) é calculada utilizando a Equação 16 e tem dependência com C e com o expoente α . O valor de C em sistema AC, pode ser determinado utilizando a Equação 17, já que corresponde ao valor de CPE na frequência máxima do $-Z''$. (CIUCCI, 2019; HIRSCHORN et al., 2010; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; PAJKOSSY; JURCZAKOWSKI, 2017)

$$Z_{CPE} = \frac{1}{C_{dl}(i\omega)^\alpha} \quad \text{Equação 16}$$

$$C_{dl} = \frac{1}{R_{tc}\omega_{-Z''_{max}}} \quad \text{Equação 17}$$

O expoente α tem relação com características morfológicas da superfície do eletrodo de trabalho, que pode variar entre $0 < \alpha < 1$. Quando $\alpha < 0,5$ o CPE apresenta comportamento

de um resistor, em situações que $\alpha \approx 0,5$ a interface apresenta características difusionais, quando α exibe valores intermediários de $0,5 < \alpha < 1$, a interface é caracterizada como porosa. À medida que os valores α se aproxima de $\alpha = 1$ a DCE apresenta comportamento próximo a de um capacitor ideal de placas paralelas e a impedância é modelada conforme a **Equação 15**. Segundo Orazem e colaboradores, α é obtido graficamente a partir da **Equação 18**. (CIUCCI, 2019; HIRSCHORN et al., 2010; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; PAJKOSSY; JURCZAKOWSKI, 2017)

$$\alpha = \left| \frac{d \log -Z''}{d \log \omega} \right| \quad \text{Equação 18}$$

A difusão desempenha um papel importante nas reações eletroquímicas e está associada ao transporte de íons em uma pequena região que fica entre a OHP e o seio da solução. O elemento de Impedância de Warburg (Z_W) é utilizado como artefato matemático para caracterizar um processo de difusão linear semi-infinita na interface de trabalho, sendo calculado utilizando a Equação 19. (LASIA, 2014; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; PAJKOSSY; JURCZAKOWSKI, 2017; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

$$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{i\omega}} \quad \text{Equação 19}$$

σ é denominado de coeficiente de difusão de Warburg e é descrito pela Equação 20, relacionado à concentração e o coeficiente de difusão das espécies envolvidas. O transporte de massa é dependente de um gradiente de concentração em função do tempo e em função da distância da superfície do eletrodo, sendo relacionado com a segunda lei de Fick. Equação 40. (HUANG, 2018; SKALE; DOLEČEK; SLEMNIK, 2007)

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A \sqrt{2}} \left(\frac{1}{D_0^{1/2} C_O^\infty} + \frac{1}{D_0^{1/2} C_R^\infty} \right) \quad \text{Equação 20}$$

$$\frac{\delta C_i(x,t)}{\delta t} = -D \frac{\delta^2 C_i(x,t)}{\delta x^2} \quad \text{Equação 21}$$

Usando as seguintes condições iniciais de contorno, $C_i(x, 0) = 0$; $C_i(0, t) = C_i^0$ e $C_i(x, t) \xrightarrow{x \rightarrow \infty} C_i^b$, sendo C_i^0 a concentração real de espécies na interface de trabalho e C_i^b

concentração das espécies no seio da solução, podemos considerar então que a concentração na interface é igual a concentração no seio da solução, tendo dependência apenas do coeficiente de difusão D , o qual é intrínseco de cada espécie química. (HUANG, 2018; SKALE; DOLEČEK; SLEMNIK, 2007)

Em um diagrama de Nyquist, como na Figura 13a, a impedância de Warburg é identificada como uma linha reta com um ângulo de 45° em relação ao eixo Z' e regiões de baixa frequência, caso esta angulação seja diferente de 45° o sistema pode ter um controle difusional finito associado a demais processos capacitivos na interface de trabalho. Desta forma evidenciando que a técnica de EIE se mostra completa pois possibilita um estudo claro e detalhado das mudanças ocorridas na interface eletrodo/solução. (HUANG, 2018; LASIA, 2014; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; PAJKOSSY; JURCZAKOWSKI, 2017; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

Assim, diante do exposto, o desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para a detecção e quantificação de HLB em amostras de citros é de suma importância, visto as dificuldades enfrentadas pelo setor na utilização de diagnósticos convencionais (PCR e ELISA), indicando a carência em dispositivos que possibilitam a realização de análises em campo. Sendo assim, uso de nanopartículas magnéticas permite a realização de análises que demandam baixo volume de amostra e possibilita a pré-concentração do Ag na superfície de trabalho, que associada a técnica de EIE permite o desenvolvimento de um biossensor com maior sensibilidade e detectabilidade ao HLB em amostras de citrus.

5. CONCLUSÃO

A síntese das nanopartículas magnéticas (mNP) e a sua silanização com aminosilano foi realizada com sucesso formando mNP|A, como pode ser observado pelas caracterizações físicas empregadas, DRX, FTIR, ζ e VSM. Foi mensurado o tamanho e formato geométrico das nanopartículas magnéticas sintetizadas.

Em relação à otimização na etapa de imobilização de Ac anti-HLB sobre as mNP|A constatou-se que as melhores condições foram: concentração de mNP|A de $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$; volume de mNP|A de $7,5 \text{ mL}$; concentração de glutaraldeído $5,0 \text{ \% m/v}$.

A imobilização do anticorpo anti-proteína OMP foram efetuadas sobre as mNP|A em solução tampão PBS 10 mM , pH $6,5$ na concentração de $120,0 \text{ pg mL}^{-1}$ em temperatura ambiente por um 180 min sob agitação constante na ausência de Tween 20, bloqueio com solução de glicina $0,5 \text{ \% m/v}$ em meio de solução tampão PBS 10 mM , pH $7,4$, sob agitação constante a temperatura ambiente por um período de 120 min . Observou-se que o uso de surfactante Tween 20 favoreceu o reconhecimento do Ag (OMP) pelos Ac imobilizados sobre mNP|A. A concentração de Ac otimizada foi de $120,0 \text{ pg mL}^{-1}$ preparadas em solução tampão PBS 10 mM , pH $6,5$.

Após a otimização das etapas de construção do biossensor, foi possível a descrição das figuras de mérito, com LD de $0,25 \text{ fg mL}^{-1}$ e LQ de $0,83 \text{ fg mL}^{-1}$ e estimação de constante de dissociação K_d igual a $759,11 \text{ fg mL}^{-1}$. Devido as características da técnica de EIE foi possível realizar ajuste de CEE com objetivo de compreender melhor as características da interface de trabalho. Constatou-se uma boa estabilidade dos materiais utilizados no desenvolvimento deste dispositivo sendo ressaltado que após etapa de liofilização a % sinal e mantém estável em até 60 dias , evidenciando assim a aplicabilidade ao longo do tempo em diferentes condições.

Verificou-se a aplicabilidade na detecção e quantificação de HLB em amostras de extratos de folhas de citros, devido o emprego de nanopartículas magnéticas, pois não se faz necessária etapa prévia de “*clean up*” das amostras vegetais.

O dispositivo desenvolvido distingue as amostras positivas ao HLB das amostras negativas ao HLB e também das negativas ao HLB, mas positivas ao CTV. Isso significa que não ocorre reação cruzada com CTV, fato extremamente importante pois os sintomas visuais das infecções são semelhantes e muitas vezes a planta pode estar contaminada com CTV e/ou HLB.

Por fim, quando confrontado o desempenho do imunossensor impedimétrico com a técnica “padrão ouro” qPCR Multiplex, os resultados indicaram conformidade. Portanto, viabiliza assim a sua utilização como uma alternativa eficiente no monitoramento e diagnóstico de HLB em pomares citrícolas.

6. Referências

- ABBAS, M.; TAKAHASHI, M.; KIM, C. Facile sonochemical synthesis of high-moment magnetite (Fe₃O₄) nanocube. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1354, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-012-1354-y>>
- AGNOLON, V.; CONTATO, A.; MENEGHELLO, A.; TAGLIABUE, E.; TOFFOLI, G.; GION, M.; POLO, F.; FABRICIO, A. S. C. ELISA assay employing epitope-specific monoclonal antibodies to quantify circulating HER2 with potential application in monitoring cancer patients undergoing therapy with trastuzumab. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 3016, 2020.
- AGRONEGÓCIO, E. B. S. | S. A história da laranja no Brasil. 2022. Disponível em: <<https://summitagro.estadao.com.br/historia-da-laranja/>>.
- AGUEDO, J.; LORENCOVA, L.; BARATH, M.; FARKAS, P.; TKAC, J. Electrochemical Impedance Spectroscopy on 2D Nanomaterial MXene Modified Interfaces: Application as a Characterization and Transducing Tool. **Chemosensors**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 127, 2020.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. [s.l.] : Wiley, 2000. Disponível em: <<https://books.google.ca/books?id=kv56QgAACAAJ>>
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. 2. ed. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. v. 2 Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41929-019-0277-8>>
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. KINETICS OF ELECTRODE REACTIONS. Em: **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto. p. 87–136.
- BARHOUM, A.; J. FORSTER, R. Label-free electrochemical immunosensor for picomolar detection of the cervical cancer biomarker MCM5. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1225, p. 340226, 2022.
- BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R. F. The Continuous Challenge of Citrus Tristeza Virus Control. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 291–316, 1989. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.py.27.090189.001451>>
- BASSANEZI, R. B.; CZERMAINSKI, A. B. C.; LARANJEIRA, F. F.; MOREIRA, A. S.; RIBEIRO, P. J.; KRAINSKI, E. T.; AMORIM, L. Spatial patterns of the Citrus leprosis virus and its associated mite vector in systems without intervention. **Plant Pathology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 85–93, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.12930>>
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JR.; J.; SPOSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicacoes para o manejo da doenca. **Citrus Research & Tecnology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 11–23, 2010.
- BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GASPAROTO, M. C. G.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 577–586, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10658-011-9779-1>>

- BENAVENTE, J. Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Tool for Electrical and Structural Characterizations of Membranes in Contact with Electrolyte Solutions. Em: **Recent Advances in Multidisciplinary Applied Physics**. [s.l.] : Elsevier, 2005. p. 463–471.
- BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P. Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 1–8, 2016.
- BINI, R. A.; MARQUES, R. F. C.; SANTOS, F. J.; CHAKER, J. A.; JAFELICCI, M. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 324, n. 4, p. 534–539, 2012.
- BITAR, A.; VEGA-CHACÓN, J.; LGOURNA, Z.; FESSI, H.; JAFELICCI, M.; ELAISSARI, A. Submicron silica shell–magnetic core preparation and characterization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 537, p. 318–324, 2018.
- BOEHRINGER, H. R.; O’FARRELL, B. J. Lateral Flow Assays in Infectious Disease Diagnosis. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 52–58, 2021.
- BOFFADOSSI, M.; DI TOCCO, A.; LASSABE, G.; PIREZ-SCHIRMER, M.; ROBLEDO, S. N.; FERNÁNDEZ, H.; ZON, M. A.; GONZÁLEZ-SAPIENZA, G.; ARÉVALO, F. J. Development of an impedimetric immunosensor to determine microcystin-LR. New approaches in the use of the electrochemical impedance spectroscopy was used in determining to determine kinetic parameters of immunoreactions. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 353, p. 136621, 2020.
- BOGUSZEWSKA, K.; SZEWCZUK, M.; URBANIAK, S.; KARWOWSKI, B. T. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 76, n. 23, p. 4689–4704, 2019.
- BOINA, D. R.; BLOOMQUIST, J. R. Chemical control of the Asian citrus psyllid and of Huanglongbing disease in citrus. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 808–823, 2015.
- BORGES, A. C. G.; MIRANDA COSTA, V. M. H. De. A Evolução do Agronegócio Citrícola Paulista e o Perfil da Intervenção do Estado. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 101, 2005. Disponível em: <<http://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/270>>
- BOVÉ, J.; BARROS, A. Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. **J Plant Pathol**, [s. l.], v. 88, 2006.
- BRAUN-KIEWNICK, A.; ALTENBACH, D.; OBERHÄNSLI, T.; BITTERLIN, W.; DUFFY, B. A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of *Erwinia amylovora* and on-site fire blight diagnosis. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 1–9, 2011.
- BRAZACA, L. C.; SAMPAIO, I.; ZUCOLOTTI, V.; JANEGITZ, B. C. Applications of biosensors in Alzheimer’s disease diagnosis. **Talanta**, [s. l.], v. 210, p. 120644, 2020.
- BREDAR, A. R. C.; CHOWN, A. L.; BURTON, A. R.; FARNUM, B. H. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Metal Oxide Electrodes for Energy Applications. **ACS Applied Energy Materials**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 66–98, 2020.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. A região interfacial. Em: **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Oxford: Oxford University Press, 1993. v. 1p. 43–75.

- BURT, R.; BIRKETT, G.; ZHAO, X. S. A review of molecular modelling of electric double layer capacitors. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s. l.], v. 16, n. 14, p. 6519, 2014.
- CARVALHO, S. A. De; GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; FERRAREZI, R. S.; COLETTA FILHO, H. Della. Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 41, n. 6, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452019000601002&tlng=en>
- CHUNG, K.; PERES, N.; TIMMER, L. Citrus Diseases Exotic to Florida: Black Spot. **EDIS**, [s. l.], v. 2005, n. 11 SE-Historical Fact Sheets, 2019. Disponível em: <<https://journals.flvc.org/edis/article/view/115115>>
- CIACCIA, M.; DI STEFANO, S. Mechanisms of imine exchange reactions in organic solvents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 646–654, 2015.
- CITRUS INDUSTRY MAGAZINE. **Decline in U.S. Citrus Production and Value**. 2022. Disponível em: <<https://citrusindustry.net/2022/09/14/decline-in-u-s-citrus-production-and-value/#:~:text=Citrus%20utilized%20production%20in%20the,Arizona%20produced%20the%20remaining%20%25.>>>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- CITRUSBR, A. N. dos E. de S. C. **Orange in the groves**. 2021. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/en/thesection/?ins=01>>. Acesso em: 1 mar. 2021.
- CIUCCI, F. Modeling electrochemical impedance spectroscopy. **Current Opinion in Electrochemistry**, [s. l.], v. 13, p. 132–139, 2019.
- CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962.
- CNA, S. C. / S. / I. **Produtores garantem competitividade da citricultura brasileira**. 2022. Disponível em: <[https://cnabrasil.org.br/noticias/dia-do-citricultor-produtores-garantem-competitividade-da-citricultura-brasileira#:~:text=Na%20safra%202021%2F2022%20at%C3%A9,de%20sucos%20C%2FAD%20tr%C3%ADcos%20\(CitrusBR\).>](https://cnabrasil.org.br/noticias/dia-do-citricultor-produtores-garantem-competitividade-da-citricultura-brasileira#:~:text=Na%20safra%202021%2F2022%20at%C3%A9,de%20sucos%20C%2FAD%20tr%C3%ADcos%20(CitrusBR).>)>. Acesso em: 25 jun. 2022.
- COPPEDÈ, N.; JANNI, M.; BETTELLI, M.; MAIDA, C. L.; GENTILE, F.; VILLANI, M.; RUOTOLO, R.; IANNOTTA, S.; MARMIROLI, N.; MARMIROLI, M.; ZAPPETTINI, A. An in vivo biosensing, biomimetic electrochemical transistor with applications in plant science and precision farming. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 16195, 2017.
- COSTA, C. C. Da; GUILHOTO, J. J. M.; IMORI, D. Importância dos setores agroindustriais na geração de renda e emprego para a economia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 787–814, 2013.
- DA GRAÇA, J. V.; DOUHAN, G. W.; HALBERT, S. E.; KEREMANE, M. L.; LEE, R. F.; VIDALAKIS, G.; ZHAO, H. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 373–387, 2016.
- DE OLIVEIRA, R. A. G.; MATERON, E. M.; MELENDEZ, M. E.; CARVALHO, A. L.; FARIA, R. C. Disposable Microfluidic Immunoarray Device for Sensitive Breast Cancer Biomarker Detection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 9, n. 33, p. 27433–27440, 2017.

- DEL CAMPO, A.; SEN, T.; LELLOUCHE, J.-P.; BRUCE, I. J. Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 293, n. 1, p. 33–40, 2005.
- DING, F.; DUAN, Y.; YUAN, Q.; SHAO, J.; HARTUNG, J. S. Serological detection of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ in citrus, and identification by GeLC-MS/MS of a chaperone protein responding to cellular pathogens. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 29272, 2016.
- DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D. G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. W.; WILLIAMS, K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ Obtained Through Metagenomics. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1011–1020, 2009.
- EL KAHLOUT, M. I.; ABU-NASER, S. S. An Expert System for Citrus Diseases Diagnosis. **International Journal of Academic Engineering Research**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 1–7, 2019. Disponível em: <<http://dstore.alazhar.edu.ps/xmlui/bitstream/handle/123456789/106/KAHAESv1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>
- ENGVAL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin g, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, [s. l.], v. 251, n. 3, p. 427–434, 1971.
- ESTEBAN, J. M.; ORAZEM, M. E. On the Application of the Kramers-Kronig Relations to Evaluate the Consistency of Electrochemical Impedance Data. **Journal of The Electrochemical Society**, [s. l.], v. 138, n. 1, p. 67–76, 1991.
- EUROPEAN COMMISSION. **The citrus market in the EU: production, areas and yields**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2022-11/citrus-production_en.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2022.
- FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 102, p. 470–478, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566317307583>>
- FOGUEL, M.; FURLAN GIORDANO, G.; DE SYLOS, C.; CARLOS, I.; PUPIM FERREIRA, A.; BENEDETTI, A.; YAMANAKA, H. A Low-Cost Label-Free AFB1 Impedimetric Immunosensor Based on Functionalized CD-Trodes. **Chemosensors**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 17, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2227-9040/4/3/17>>
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Citrus Fruit Statistical Compendium 2020**. Rome. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>>.
- FREITAS, T. A.; PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; MAGNANI, R. F.; FARIA, R. C. Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device. **Talanta**, [s. l.], v. 205, p. 120110, 2019. a.
- FREITAS, T. A.; PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; MAGNANI, R. F.; FARIA, R. C. Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza

virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device. **Talanta**, [s. l.], v. 205, p. 120110, 2019. b.

FRIÁK, M.; SCHINDLMAYR, A.; SCHEFFLER, M. Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite. **New Journal of Physics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5–5, 2007.

FUNDECITRUS. **LEVANTAMENTO DA INCIDÊNCIA DAS DOENÇAS DOS CITROS: GREENING, CVC E CANCRO CÍTRICO NO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO**, 2001. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Relatorio_levantamento_de_doencas_2021-greening_CVC_e_cancro_citrico.pdf>

FUNDECITRUS. **Manejo do greening**. Araraquara: Fundo de Defesa da Citricultura, 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/ManualZgreening_2018-19Z1.pdf>

FUNDECITRUS. **FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA**. 2021a. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em: 1 mar. 2021.

FUNDECITRUS. **Cancro cítrico: Panorama Nacional**. 2021b. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/cancro-citrico-panorama-nacional/982#:~:text=INCIDÊNCIA NO CINTURÃO CITRÍCOLA,do levantamento 2020 do Fundecitrus.>>. Acesso em: 26 jun. 2022.

FUNDECITRUS. **REESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2019/20 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO/SUDOESTE MINEIRO**, 2021. c. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0420_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf>

FURST, A. L.; HOEPKER, A. C.; FRANCIS, M. B. Quantifying Hormone Disruptors with an Engineered Bacterial Biosensor. **ACS Central Science**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 110–116, 2017.

GAO, S.; GUISÁN, J. M.; ROCHA-MARTIN, J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1189, p. 338907, 2022.

GARNSEY, S. M.; LEE, R. F. Tristeza. Em: **Compendium of citrus diseases**. São Paulo: APS Press, 1989. p. 48–50.

GHOSH CHAUDHURI, R.; PARIA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 2373–2433, 2012.

GMITTER, F. G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary citrus species (rutaceae). **Economic Botany**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 267–277, 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02860491>>

GOTTWALD, T. R. Cancro cítrico. **Plant Health Instructor**, [s. l.], 2013. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/CitrusCankerPort.aspx>>

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

GROUP, M. **Safra 2022/23 de laranja deve ser 20,53% maior: 316,95 milhões de caixas**. 2022. Disponível em: <<https://www.markestrat.com.br/safra-2022-23-de-laranja-deve-ser-2053-maior-31695-milhoes-de-caixas/>>. Acesso em: 23 jun. 2022.

- GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204009317>>
- HAMMOND, J. L.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P.; CARRARA, S.; TKAC, J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 69–80, 2016. Disponível em: <<https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/60/1/69/78228/Electrochemical-biosensors-and-nanobiosensors>>
- HASSE, G. **A Laranja no brasil, 1500-1987* a historia da agroindustria citrica brasileira, dos quintais coloniais as fabricas exportadoras de suco do seculo xx**. [s.l.] : Duprat & Iobe, 1987. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=1AX1ZwEACAAJ>>
- HEAVISIDE, O. **Electromagnetic Theory**. [s.l.] : Cambridge University Press, 2011.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996.
- HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. [s.l.] : Elsevier Science, 2013. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=6aO-207lhdgC>>
- HIRSCHORN, B.; ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B.; VIVIER, V.; FRATEUR, I.; MUSIANI, M. Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 55, n. 21, p. 6218–6227, 2010.
- HUANG, J. Diffusion impedance of electroactive materials, electrolytic solutions and porous electrodes: Warburg impedance and beyond. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 281, p. 170–188, 2018.
- JAGOUÉIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. PCR detection of the two 'Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 43–50, 1996.
- JANASI, S. R.; EMURA, M.; LANDGRAF, F. J. G.; RODRIGUES, D. The effects of synthesis variables on the magnetic properties of coprecipitated barium ferrite powders. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 238, n. 2–3, p. 168–172, 2002.
- JARA, M. D. L.; ALVAREZ, L. A. C.; GUIMARÃES, M. C. C.; ANTUNES, P. W. P.; DE OLIVEIRA, J. P. Lateral flow assay applied to pesticides detection: recent trends and progress. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 29, n. 31, p. 46487–46508, 2022.
- JEEVANANDAM, J.; BARHOUM, A.; CHAN, Y. S.; DUFRESNE, A.; DANQUAH, M. K. **Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations**, Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften, 2018.
- JIA, Y.; LI, J. Molecular Assembly of Schiff Base Interactions: Construction and Application. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 1597–1621, 2015.
- JOLIVET, J. P. Influence of Fe(II) on the Formation of the Spinel Iron Oxide in Alkaline Medium. **Clays and Clay Minerals**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 531–539, 1992.
- JONES, A. L.; DHANAPALA, L.; BALDO, T. A.; SHARAFELDIN, M.; KRAUSE, C. E.; SHEN, M.; MOGHADDAM, S.; FARIA, R. C.; DEY, D. K.; WATSON, R. W.; ANDRAWIS, R.; LEE, N. H.; RUSLING, J. F. Prostate Cancer Diagnosis in the Clinic Using an 8-Protein Biomarker Panel. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 1059–1067, 2021.

JOSELEVICH, M.; WILLIAMS, F. J. Synthesis and Characterization of Diazonium Functionalized Nanoparticles for Deposition on Metal Surfaces. **Langmuir**, [s. l.], v. 24, n. 20, p. 11711–11717, 2008.

KALATZIS, A. E.; ALVES, F.; PAULILLO, L. F. REPRESENTAÇÃO DE INTERESSES E NEGOCIAÇÃO NO COMPLEXO AGROINDUSTRIAL CÍTRÍCOLA BRASILEIRO: TRANSIÇÃO PARA UM NOVO PADRÃO POLÍTICO? **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 9–34, 1999.

KIM, D. K.; ZHANG, Y.; VOIT, W.; RAO, K. V.; MUHAMMED, M. **Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. [s.l: s.n.].

KIM, H.; KIM, D. Polysuccinimide graft copolymer nano aggregates encapsulating magnetites for imaging probe. **Macromolecular Research**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 259–265, 2012.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M.; RODRIGUES, J. C. V. Brevipalpus-Transmitted Plant Virus and Virus-Like Diseases: Cytopathology and Some Recent Cases. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 30, n. 1–3, p. 135–160, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:APPA.0000006546.55305.e3>>

KLABUNDE, K. J.; RICHARDS, R. M. **Nanoscale Materials in Chemistry**. [s.l.] : Wiley, 2001.

KRIVITSKY, V.; GRANOT, E.; AVIDOR, Y.; BORBERG, E.; VOEGELE, R. T.; PATOLSKY, F. Rapid Collection and Aptamer-Based Sensitive Electrochemical Detection of Soybean Rust Fungi Airborne Urediniospores. **ACS Sensors**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 1187–1198, 2021.

KUMAR, H.; KUMARI, N.; SHARMA, R. Nanocomposites (conducting polymer and nanoparticles) based electrochemical biosensor for the detection of environment pollutant: Its issues and challenges. **Environmental Impact Assessment Review**, [s. l.], v. 85, p. 106438, 2020.

KURAMAE-IZIOKA, E. E.; LOPES, C. R.; SOUZA, N. L.; MACHADO, M. A. Morphological and molecular characterization of Colletotrichum spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 323–329, 1997.

KUZNETSOVA, N. P.; MISHAEVA, R. N.; GUDKIN, L. R.; PANARIN, E. F. Reactions of glutaraldehyde with dipolar ions of amino acids and proteins. **Russian Chemical Bulletin**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 918–927, 2013.

LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. [s. l.], v. 72, n. 11, p. 4847–4854, 1950. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>

LASIA, A. Definition of Impedance and Impedance of Electrical Circuits. Em: **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 7–66.

LEON M., G. A.; REALPE, C. E.; GARZON, P. A.; RODRIGUEZ, J. A.; MORENO P., M. G.; CHILDERS, C. C.; ACHOR, D.; FREITAS-ASTUA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; SALAROLI, R. B.; MESA C., N. C.; KITAJIMA, E. W. Occurrence of Citrus leprosis virus in

- Llanos Orientales, Colombia. **Plant Disease**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 682–682, 2006. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PD-90-0682C>>
- LEONARDO, S.; TOLDRÀ, A.; CAMPÀS, M. Biosensors Based on Isothermal DNA Amplification for Bacterial Detection in Food Safety and Environmental Monitoring. **Sensors**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 602, 2021.
- LI, S.; WU, F.; DUAN, Y.; SINGERMAN, A.; GUAN, Z. Citrus Greening: Management Strategies and Their Economic Impact. **HortScience**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 604–612, 2020. Disponível em: <<https://journals.ashs.org/view/journals/hortsci/55/5/article-p604.xml>>
- LI, X.-M.; YANG, X.-Y.; ZHANG, S.-S. Electrochemical enzyme immunoassay using model labels. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 543–553, 2008.
- LINDENMANN, J. SENIOR OVERVIEWS. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 281–285, 1984.
- LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 2008. a.
- LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 2008. b.
- LITMAN, G. W.; RAST, J. P.; SHAMBLOTT, M. J.; HAIRE, R. N.; HULST, M.; ROESS, W.; LITMAN, R. T.; HINDS-FREY, K. R.; ZILCH, A.; AMEMIYA, C. T. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], 1993.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOCALI-FABRIS, E. C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M. L. P. N.; MACHADO, M. A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 87, n. 9, p. 2721–2729, 2006. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.82038-0>>
- LU, A.-H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.
- LU, L.; CHENG, B.; YAO, J.; PENG, A.; DU, D.; FAN, G.; HU, X.; ZHANG, L.; CHEN, G. A New Diagnostic System for Detection of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ Infection in Citrus. **Plant Disease**, [s. l.], v. 97, n. 10, p. 1295–1300, 2013.
- LURO, F.; CURK, F.; FROELICHER, Y.; OLLITRAULT, P. **Recent insights on Citrus diversity and phylogeny**. Naples: Publications du Centre Jean Bérard, 2017. Disponível em: <<http://books.openedition.org/pcjb/2169>>
- LV, M.; LIU, Y.; GENG, J.; KOU, X.; XIN, Z.; YANG, D. Engineering nanomaterials-based biosensors for food safety detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 106, p. 122–128, 2018.

MACDONALD, D. D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 51, n. 8–9, p. 1376–1388, 2006.

MACDONALD, J. R.; JOHNSON, W. B. Fundamentals of Impedance Spectroscopy. Em: **Impedance Spectroscopy**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2018. p. 1–20.

MAHESHWARI, Y.; SELVARAJ, V.; HAJERI, S.; RAMADUGU, C.; KEREMANE, M. L.; YOKOMI, R. K. On-site detection of Citrus tristeza virus (CTV) by lateral flow immunoassay using polyclonal antisera derived from virions produced by a recombinant CTV. **Phytoparasitica**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 333–340, 2017.

MAIA, M. L. **Citricultura paulista: evolução, estrutura e acordos de preço**. 1992. Dissertação - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) Universidade São Paulo -USP, [s. l.], 1992.

MANSURIYA, B. D.; ALTINTAS, Z. Enzyme-Free Electrochemical Nano-Immunosensor Based on Graphene Quantum Dots and Gold Nanoparticles for Cardiac Biomarker Determination. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 578, 2021.

MARQUIÉ, C. Chemical Reactions in Cottonseed Protein Cross-Linking by Formaldehyde, Glutaraldehyde, and Glyoxal for the Formation of Protein Films with Enhanced Mechanical Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 10, p. 4676–4681, 2001.

MARTINS, G.; GOGOLA, J. L.; BUDNI, L. H.; JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1147, p. 30–37, 2021.

MENDES, R. K.; FREIRE, R. S.; FONSECA, C. P.; NEVES, S.; KUBOTA, L. T. Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 849–855, 2004.

MISTRY, K. K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. **The Analyst**, [s. l.], v. 139, n. 10, p. 2289, 2014.

MOHAMMAD DANESH, N.; RAMEZANI, M.; SARRESHTEHDAR EMRANI, A.; ABNOUS, K.; TAGHDISI, S. M. A novel electrochemical aptasensor based on arch-shape structure of aptamer-complimentary strand conjugate and exonuclease I for sensitive detection of streptomycin. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 75, p. 123–128, 2016.

MORGAN, J. K.; ZHOU, L.; LI, W.; SHATTERS, R. G.; KEREMANE, M.; DUAN, Y.-P. Improved real-time PCR detection of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. **Molecular and Cellular Probes**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 90–98, 2012.

MOSHE, M.; DAUNT, A.; FLOWER, B.; SIMMONS, B.; BROWN, J. C.; FRISE, R.; PENN, R.; KUGATHASAN, R.; PETERSEN, C.; STOCKMANN, H.; ASHBY, D.; RILEY, S.; ATCHISON, C.; TAYLOR, G. P.; SATKUNARAJAH, S.; NAAR, L.; KLABER, R.; BADHAN, A.; ROSADAS, C.; MARCHESIN, F.; FERNANDEZ, N.; SUREDA-VIVES, M.; CHEESEMAN, H.; O’HARA, J.; SHATTOCK, R.; FONTANA, G.; PALLETT, S. J. C.; RAYMENT, M.; JONES, R.; MOORE, L. S. P.; ASHRAFIAN, H.; CHERAPANOV, P.

TEDDER, R.; MCCLURE, M.; WARD, H.; DARZI, A.; ELLIOTT, P.; COOKE, G. S.; BARCLAY, W. S. SARS-CoV-2 lateral flow assays for possible use in national covid-19 seroprevalence surveys (React 2): diagnostic accuracy study. **BMJ**, [s. l.], p. n423, 2021.

MULLER, G. **Complexo Agroindustrial e Modernização Agrária**. São Paulo: EDUC-Hucitec, 1989.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A. A. ; RODRIGUES, J. C. V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. Em: **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005. p. 567–60.

MURRAY, C. B.; KAGAN, C. R.; BAWENDI, M. G. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. **Annual Review of Materials Research**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 545–610, 2000. Disponível em: <www.annualreviews.org>

NAGARAJAN, R.; HATTON, T. A. **Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization**. Washington, DC: American Chemical Society, 2008. v. 996 Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/book/10.1021/bk-2008-0996>

NATIONMASTER. **Top Countries in Oranges Production - Source FAO**. 2022. Disponível em: <https://www.nationmaster.com/nmx/ranking/oranges-production>. Acesso em: 23 jun. 2022.

NETZ, R. R. Water and ions at interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, [s. l.], v. 9, n. 1–2, p. 192–197, 2004.

NEVES, M. F. **Perspectivas para o agronegócio neste 2018**. 2018.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; KALAKI, R. **The orange juice landscape**. First published ed. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2011. v. 1

NIBLETT, C. L.; GENC, H.; CEVIK, B.; HALBERT, S.; BROWN, L.; NOLASCO, G.; BONACALZA, B.; MANJUNATH, K. L.; FEBRES, V. J.; PAPPU, H. R.; LEE, R. F. Progress on strain differentiation of Citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. **Virus Research**, [s. l.], v. 71, n. 1–2, p. 97–106, 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016817020000191X>

OLDE DAMINK, L. H. H.; DIJKSTRA, P. J.; VAN LUYN, M. J. A.; VAN WACHEM, P. B.; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 460–472, 1995.

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470381588>

OU, G.; ZHAO, A.; LIAO, H.; ZHANG, Z.; XIAO, F. Au nanoparticles decorated urchin-like Bi₂S₃ on graphene wrapped carbon fiber microelectrode: Towards electrochemical immunosensor for sensitive determination of aflatoxin B₁. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 929, p. 117124, 2023.

PAGLIACCIA, D.; SHI, J.; PANG, Z.; HAWARA, E.; CLARK, K.; THAPA, S. P.; DE FRANCESCO, A. D.; LIU, J.; TRAN, T.-T.; BODAGHI, S.; FOLIMONOVA, S. Y.; ANCONA,

- V.; MULCHANDANI, A.; COAKER, G.; WANG, N.; VIDALAKIS, G.; MA, W. A Pathogen Secreted Protein as a Detection Marker for Citrus Huanglongbing. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, 2017.
- PAJKOSSY, T.; JURCZAKOWSKI, R. Electrochemical impedance spectroscopy in interfacial studies. **Current Opinion in Electrochemistry**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 53–58, 2017.
- PAROLO, C.; MERKOÇI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. **Chem. Soc. Rev.**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 450–457, 2013.
- PILLONI, M.; NICOLAS, J.; MARSAUD, V.; BOUCHEMAL, K.; FRONGIA, F.; SCANO, A.; ENNAS, G.; DUBERNET, C. PEGylation and preliminary biocompatibility evaluation of magnetite–silica nanocomposites obtained by high energy ball milling. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 401, n. 1–2, p. 103–112, 2010.
- PILON, L.; WANG, H.; D'ENTREMONT, A. Recent Advances in Continuum Modeling of Interfacial and Transport Phenomena in Electric Double Layer Capacitors. **Journal of The Electrochemical Society**, [s. l.], v. 162, n. 5, p. A5158–A5178, 2015.
- PRIETO-SIMÓN, B.; SAINT, C.; VOELCKER, N. H. Electrochemical Biosensors Featuring Oriented Antibody Immobilization via Electrografted and Self-Assembled Hydrazide Chemistry. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 1422–1429, 2014.
- PROENÇA, C. A.; FREITAS, T. A.; BALDO, T. A.; MATERÓN, E. M.; SHIMIZU, F. M.; FERREIRA, G. R.; SOARES, F. L. F.; FARIA, R. C.; OLIVEIRA, O. N. Use of data processing for rapid detection of the prostate-specific antigen biomarker using immunomagnetic sandwich-type sensors. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [s. l.], v. 10, p. 2171–2181, 2019.
- PUPIM FERREIRA, A. Ap.; ALVES, M. J. M.; BARROZO, S.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. Optimization of incubation time of protein Tc85 in the construction of biosensor: Is the EIS a good tool? **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 643, n. 1–2, p. 1–8, 2010.
- QRIQUET, Z.; CHERRAH, Y.; SEFRIQUI, H.; QMICHOU, Z. Monoclonal Antibodies Application in Lateral Flow Immunochromatographic Assays for Drugs of Abuse Detection. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1058, 2021.
- RAEISOSSADATI, M. J.; DANESH, N. M.; BORNA, F.; GHOLAMZAD, M.; RAMEZANI, M.; ABNOUS, K.; TAGHDISI, S. M. Lateral flow based immunobiosensors for detection of food contaminants. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 86, p. 235–246, 2016.
- RAMIMOGHADAM, D.; BAGHERI, S.; HAMID, S. B. A. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 368, p. 207–229, 2014.
- RASHAD, M. M.; EL-SAYED, H. M.; RASLY, M.; NASR, M. I. Induction heating studies of magnetite nanospheres synthesized at room temperature for magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 324, n. 23, p. 4019–4023, 2012.
- RATNARATHORN, N.; CHAILAPAKUL, O.; DUNGCHAI, W. Highly sensitive colorimetric detection of lead using maleic acid functionalized gold nanoparticles. **Talanta**, [s. l.], v. 132, p. 613–618, 2015.
- RAVALLI, A.; DA ROCHA, C. G.; YAMANAKA, H.; MARRAZZA, G. A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection: The case of HER2.

- Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 106, p. 268–275, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567539415300153>>
- REGIART, M.; GIMENEZ, A. M.; LOPES, A. T.; CARREÑO, M. N. P.; BERTOTTI, M. Ultrasensitive microfluidic electrochemical immunosensor based on electrodeposited nanoporous gold for SOX-2 determination. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1127, p. 122–130, 2020.
- RIBEIRO ROSSI, F.; VITALE TORKOMIAN, A. L. The innovative process of Brazilian and US orange juice processors: a comparison using patent analysis. **Revista Gestão da Produção Operações e Sistemas**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 69–82, 2015. Disponível em: <<http://www.gepros.feb.unesp.br/index.php/gepros/article/view/1280/665>>
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. IDENTIFICATION METHODS | Real-Time PCR. Em: **Encyclopedia of Food Microbiology**. [s.l.] : Elsevier, 2014. p. 344–350.
- RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1747, 2010.
- RUIZ, N.; SILHAVY, T. J. Sensing external stress: watchdogs of the Escherichia coli cell envelope. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 122–126, 2005.
- S.A, G. C. e P. **Citricultura brasileira é a maior do mundo**. 2022. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/sao-carlos-regiao/especial-publicitario/fundo-de-defesa-da-citricultura/unidos-contr-o-greening/noticia/citricultura-brasileira-e-a-maior-do-mundo.ghtml>>. Acesso em: 23 jun. 2022.
- SAJID, M.; KAWDE, A.-N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 689–705, 2015.
- SANTOS, A. Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, [s. l.], v. S7, n. 012, 2014.
- SANTOS, A.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. A dual marker label free electrochemical assay for Flavivirus dengue diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 100, p. 519–525, 2018.
- SAPSFORD, K. E.; ALGAR, W. R.; BERTI, L.; GEMMILL, K. B.; CASEY, B. J.; OH, E.; STEWART, M. H.; MEDINTZ, I. L. **Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology**, 2013.
- SATHISH, S.; BALAKUMAR, S. Influence of physicochemical interactions of capping agent on magnetic properties of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 173, p. 364–371, 2016.
- SAYER, J. M.; PESKIN, M.; JENCKS, W. P. Imine-Forming Elimination Reactions. I. General Base Acid Catalysis and Influence of the Nitrogen Substituent on Rates and Equilibria for Carbinolamine Dehydration. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 95, n. 13, p. 4277–4287, 1973.
- SCORA, R. W. On the History and Origin of Citrus. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 369, 1975. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/2484763?origin=crossref>>

SHEN, X.-C.; FANG, X.-Z.; ZHOU, Y.-H.; LIANG, H. Synthesis and Characterization of 3-Aminopropyltriethoxysilane-Modified Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. **Chemistry Letters**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1468–1469, 2004.

SHUKLA, P. K.; ORAZEM, M. E.; CRISALLE, O. D. Validation of the measurement model concept for error structure identification. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 49, n. 17–18, p. 2881–2889, 2004.

SKALE, S.; DOLEČEK, V.; SLEMNIK, M. Substitution of the constant phase element by Warburg impedance for protective coatings. **Corrosion Science**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 1045–1055, 2007.

SOUSA FILHO, P. C. De; SERRA, O. A. LIQUID PHASE SYNTHESIS METHODOLOGIES FOR THE OBTAINMENT OF RARE EARTH-BASED INORGANIC NANOMATERIALS. **Química Nova**, [s. l.], 2015.

SUN, Q.; CHEN, Y.; LI, F.; JIA, M.; SHI, G. A one-step incubation ELISA kit for rapid determination of dibutyl phthalate in water, beverage and liquor. **Open Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 392–400, 2019.

SYAHIR, A.; USUI, K.; TOMIZAKI, K.; KAJIKAWA, K.; MIHARA, H. Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays. **Microarrays**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 228–244, 2015.

TAJADINI, M.; PANJEHPOUR, M.; JAVANMARD, S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. **Advanced Biomedical Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 85, 2014.

TANAKA, F. A. O.; COLETTA-FILHO, H. Della; ALVES, K. C. S.; SPINELLI, M. O.; MACHADO, M. A.; KITAJIMA, E. W. Detection of the “Candidatus Liberibacter americanus” in phloem vessels of experimentally infected cataranthus roseus by scanning electron microscopy. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 519–519, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582007000600013&lng=en&tlng=en>

TAYLOR, C. R.; SHI, S.-R.; BARR, N. J. Techniques of Immunohistochemistry. Em: DABBS, D. J. (Ed.). **Diagnostic Immunohistochemistry**. THIRD EDITION ed. Amesterdã: Elsevier, 2011. p. 1–41.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; COUTURE, C.; MARTINS, E. C.; WULFF, N. A.; EVEILLARD-JAGOEIX, S.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Distribution and quantification of Candidatus Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 139–150, 2008. b.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification 1 International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytic. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566301001154>>

TIMMER, L. W.; PERES, N. A. Where have all the flowers gone? Postbloom fruit drop of citrus in the Americas. **Journal of Citrus Pathology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–6, 2015.

- TOGASHI, T.; UMETSU, M.; NAKA, T.; OHARA, S.; HATAKEYAMA, Y.; ADSCHIRI, T. One-pot hydrothermal synthesis of an assembly of magnetite nanoneedles on a scaffold of cyclic-diphenylalanine nanorods. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 3991–3999, 2011.
- TRAN, N. T.; MILES, A. K.; DIETZGEN, R. G.; DEWDNEY, M. M.; ZHANG, K.; ROLLINS, J. A.; DRENTH, A. Sexual Reproduction in the Citrus Black Spot Pathogen, *Phyllosticta citricarpa*. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 732–739, 2017. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-11-16-0419-R>>
- TRICOLI, A.; NERI, G. **Miniaturized bio-and chemical-sensors for point-of-care monitoring of chronic kidney diseases**, MDPI AG, 2018.
- ULIANA, C. V.; DE OLIVEIRA, T. R.; COMINETTI, M. R.; FARIA, R. C. Label-free evaluation of small-molecule–protein interaction using magnetic capture and electrochemical detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 411, n. 10, p. 2111–2119, 2019.
- UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. The Enzyme Electrode. **Nature**, [s. l.], v. 214, n. 5092, p. 986–988, 1967.
- VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **BioTechniques**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 619–626, 2008.
- VAYSSIÈRES, L.; CHANÉAC, C.; TRONC, E.; JOLIVET, J. P. Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 205, n. 2, p. 205–212, 1998.
- VENTURINI ULIANA, C.; YAMANAKA, H. Immunosensor for Detection of the Textile Dye Disperse Orange 1 Based on Non-conventional Competitive Assay. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 70–75, 2020. a.
- VENTURINI ULIANA, C.; YAMANAKA, H. Immunosensor for Detection of the Textile Dye Disperse Orange 1 Based on Non-conventional Competitive Assay. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 70–75, 2020. b.
- VINICIUS FOGUEL, M.; PILON DOS SANTOS, G.; APARECIDO PUPIM FERREIRA, A.; YAMANAKA, H.; VICENTE BENEDETTI, A. Amperometric Immunosensor for Chagas' Disease Using Gold CD-R Transducer. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 2555–2561, 2011.
- WANG, K.; QIN, W.; HOU, Y.; XIAO, K.; YAN, W. The Application of Lateral Flow Immunoassay in Point of Care Testing: A Review. **Nano Biomedicine and Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2016.
- WULFF, N. A.; FASSINI, C. G.; MARQUES, V. V.; MARTINS, E. C.; COLETTI, D. A. B.; TEIXEIRA, D. do C.; SANCHES, M. M.; BOVÉ, J. M. Molecular Characterization and Detection of 16SrIII Group Phytoplasma Associated with Huanglongbing Symptoms. **Phytopathology®**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 366–374, 2019.
- XIN, X.; WEI, Q.; YANG, J.; YAN, L.; FENG, R.; CHEN, G.; DU, B.; LI, H. Highly efficient removal of heavy metal ions by amine-functionalized mesoporous Fe₃O₄ nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 184, p. 132–140, 2012.

- XING, G.; SUN, X.; LI, N.; LI, X.; WU, T.; WANG, F. New Advances in Lateral Flow Immunoassay (LFI) Technology for Food Safety Detection. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 19, p. 6596, 2022.
- XU, Z.; LIU, Q.; FINCH, J. A. Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane on nanosized superparamagnetic particles: I. Direct silanation. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 120, n. 3–4, p. 269–278, 1997.
- YAMAMOTO, P.; ALVES, G.; BELOTI, V. Manejo e controle do huanglongbing (HLB) dos cítricos / Management and control of the citrus huanglongbing (HLB). **Investigación agraria**, [s. l.], v. 16, p. 69–82, 2014.
- YAMANAKA, H.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; FERREIRA, ANTONIO APARECIDO PUPIM. **Biossensores eletroquímicos**. Primeira ed. São Paulo: Letra Boreal, 2009. v. 1
- YANG, J.; GOMES DA ROCHA, C.; WANG, S.; PUPIM FERREIRA, A. A.; YAMANAKA, H. A label-free impedimetric immunosensor for direct determination of the textile dye Disperse Orange 1. **Talanta**, [s. l.], v. 142, p. 183–189, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914015002805>>
- ZENG, H.; GUO, W.; LIANG, B.; LI, J.; ZHAI, X.; SONG, C.; ZHAO, W.; FAN, E.; LIU, Q. Self-paired monoclonal antibody lateral flow immunoassay strip for rapid detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 408, n. 22, p. 6071–6078, 2016.
- ZHANG, N.; LIU, B.; CUI, X.; LI, Y.; TANG, J.; WANG, H.; ZHANG, D.; LI, Z. Recent advances in aptasensors for mycotoxin detection: On the surface and in the colloid. **Talanta**, [s. l.], v. 223, p. 121729, 2021.
- ZHANG, X.; WU, T.; YANG, Y.; WEN, Y.; WANG, S.; XU, L.-P. Superwetable electrochemical biosensor based on a dual-DNA walker strategy for sensitive *E. coli* O157: H7 DNA detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 321, p. 128472, 2020.
- ZHANG, X.; ZHOU, R.; RAO, W.; SHANGHAI 201800 P.R. CHINA, S. 201800 P. R. C.; SHANGHAI 201800 P.R. C, S. 201800 P. R. Influence of precipitator agents NaOH and NH₄OH on the preparation of Fe₃O₄ nano-particles synthesized by electron beam irradiation. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, [s. l.], v. 270, n. 2, p. 285–289, 2006.
- ZHAO, F.; HE, J.; LI, X.; BAI, Y.; YING, Y.; PING, J. Smart plant-wearable biosensor for in-situ pesticide analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 170, p. 112636, 2020.
- ZHU, X.; WANG, X.; HAN, L.; CHEN, T.; WANG, L.; LI, H.; LI, S.; HE, L.; FU, X.; CHEN, S.; XING, M.; CHEN, H.; WANG, Y. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 166, p. 112437, 2020.