

## Plataforma nanoestruturada baseada em nanopartículas de óxido de zinco para imunodeteção de Aflatoxina B1

### Nanostructured platform based on zinc oxide nanoparticles for aflatoxin B1 immunodetection

DOI:10.34117/bjdv7n1-453

Recebimento dos originais: 18/12/2020

Aceitação para publicação: 18/01/2021

#### **Beatriz Santiago Guerra**

Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica- UFPE, Recife, PE  
E-mail: guerrabsantiago@gmail.com

#### **César Augusto Souza de Andrade**

Departamento de Bioquímica- Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados- UFPE  
Recife, PE  
E-mail:csrandade@gmail.com

#### **Maria Danielly Lima de Oliveira**

Departamento de Bioquímica- Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados- UFPE  
Recife, PE  
E-mail: m\_danielly@yahoo.com.br

#### **RESUMO**

As micotoxinas (MTXs), são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, como fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. A biodeteção de AFB1 possui importância para a saúde pública, devido aos efeitos que ocasiona na saúde humana, além de apresentar ocorrência em boa parte dos gêneros alimentícios. Dessa forma, novos métodos de detecção são de interesse por possibilitarem uma avaliação rápida e precisa dos contaminantes de alimentos com destaque para os imunossensores. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biodispositivo nanoestruturado para biodeteção eletroquímica da AFB1 baseado em camadas automontadas de cisteína (cys) e nanopartículas de óxido de zinco (NPsZnO). As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para o desenvolvimento do imunossensor. Inicialmente, as NPsZnO foram aminadas para propiciar ancoragem na superfície eletródica e posterior imobilização do anticorpo anti-AFB1(anti-AFB1). A superfície do eletrodo foi modificada com Cys e subsequente ativação de grupos carboxi-terminais com N-hidroxissuccinimida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC). Em seguida, as NPsZnO aminadas foram adicionadas na monocamada auto-organizada de Cys e, posteriormente, moléculas de anti-AFB1 foram quimicamente ligadas. Variações das correntes de pico anódicas e catódicas e na resistência de transferência de carga foram avaliadas após cada etapa de modificação para obtenção do biossensor. Assim, uma plataforma sensora (Cys/NPsZnO/anti-AFB1) foi obtida com efetividade para detectar AFB1. O sensor proposto mostrou sensibilidade e especificidade para as moléculas de AFB1.

**Palavras-chave:** Imunossensor, Aflatoxina B1, Micotoxinas e Eletroquímica.

## ABSTRACT

Mycotoxins (MTXs), are secondary metabolites produced by some species of fungi, such as *Aspergillus* and *Penicillium*. The biodetection of AFB1 has importance for public health, due to its effects on human health, in addition to its occurrence in most foodstuffs. Thus, new detection methods are of interest because they allow a fast and accurate evaluation of food contaminants with emphasis on immunosensors. The present work aimed at the development of a nanostructured bio-device for AFB1 electrochemical biodetection based on self-assembled layers of cysteine (cys) and zinc oxide nanoparticles (NPsZnO). Cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques were used for the development of the immunosensor. Initially, the NPsZnO were aminated to provide anchorage on the electrodic surface and subsequent immobilization of the anti-AFB1 (anti-AFB1) antibody. The electrode surface was modified with Cys and subsequent activation of carboxy-terminal groups with N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDC). Next, the amino NPsZnO were added to the self-organized monolayer of Cys and, later, anti-AFB1 molecules were chemically bound. Variations in the anodic and cathodic peak currents and load transfer resistance were evaluated after each modification step to obtain the biosensor. Thus, a sensing platform (Cys/NPsZnO/anti-AFB1) was effectively obtained to detect AFB1. The proposed sensor showed sensitivity and specificity for AFB1 molecules.

**Keywords:** Immunosensor, Aflatoxin B1, Mycotoxins and Electrochemistry.

## 1 INTRODUÇÃO

O termo micotoxina é usado para designar um grupo de compostos altamente tóxicos, produzidos por alguns fungos ou leveduras (Bennett & Klich, 2003), se desenvolvem condições de campo, transporte ou durante o período de armazenamento dos alimentos (Fink-gremmels, 2008), sendo prejudiciais à saúde humana; estas podem causar doenças ou morte quando ingeridas pelo homem. As micotoxinas (MTXs) mais proeminentes são da família das aflatoxinas, e o interesse no estudo das MTXs presentes em alimentos e rações advém do interesse em garantir a saúde humana (Wild & Gong, 2019).

A aflatoxina B1 (AFB1) é a mais tóxica das aflatoxinas, causando uma variedade de efeitos adversos e, em alguns casos, podem ser letais, apresentam propriedades carcinogênica, teratogênica, mutagênicas e imunossupressoras (Anklam et al., 2002).

O uso de imunoensaios tornou-se uma eficiente ferramenta analítica na análise de MTXs em alimentos, destacando-se os ensaios imunoenzimático (ELISA), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de massa, dentre outras (GONZÁLEZ-OSNAYA et al., 2008), no entanto, a demanda de reagentes com elevado

grau de pureza destinado à análise cromatográfica e o alto custo da instrumentação e manutenção impossibilita uma análise rápida e de baixo custo (Khan et al., 2009).

Em adição, há a necessidade de se aplicar novas ferramentas analíticas para o desenvolvimento de biossensores para MTXs, como a AFB1, e os imunossensores demonstram ser úteis para a detecção, por fazerem uso de interações específicas entre um anticorpo e um antígeno. Estas interações são de natureza não covalente, porém fortes, apresentando como propriedades o favorecimento de um diagnóstico sensível, precoce e confiável, visando a diminuição de gastos com a saúde pública e tratamento medicamentoso, melhorando a qualidade de vida do paciente, possibilitando a geração de um novo produto comercial voltado para o diagnóstico (Hosu et al., 2018).

A associação de óxidos de metais como a nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO) aos biossensores se destaca em biossensores, uma vez que, as NpsZnO apresentam características semicondutoras, uma elevada razão superficial, alta eficiência catalítica e não toxicidade (Khan et al., 2016).

Os métodos eletroanalíticos, tais como voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (potencial, carga e corrente) e podem ser utilizadas para o estudo da interação entre biomoléculas e plataformas nanoestruturadas (Wang et al., 2013).

Portanto, o presente trabalho tem por objeto a exposição de resultados preliminares da construção de um sistema imunossensor para detecção de Aflatoxina B1, baseado na utilização de nanoestruturas, e os dados obtidos através de técnicas eletroanalíticas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 MATERIAIS

A ocratoxina A (*Aspergillus ochraceus*), aflatoxina B1, imunoglobulina para AFB1, N-hidroxissuccinimida (NHS), hidrocloreto de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), soro albumina bovina (BSA), nanopartículas de óxido de zinco, a imunoglobulina para AFB1 e as micotoxinas foram obtidos da Sigma.

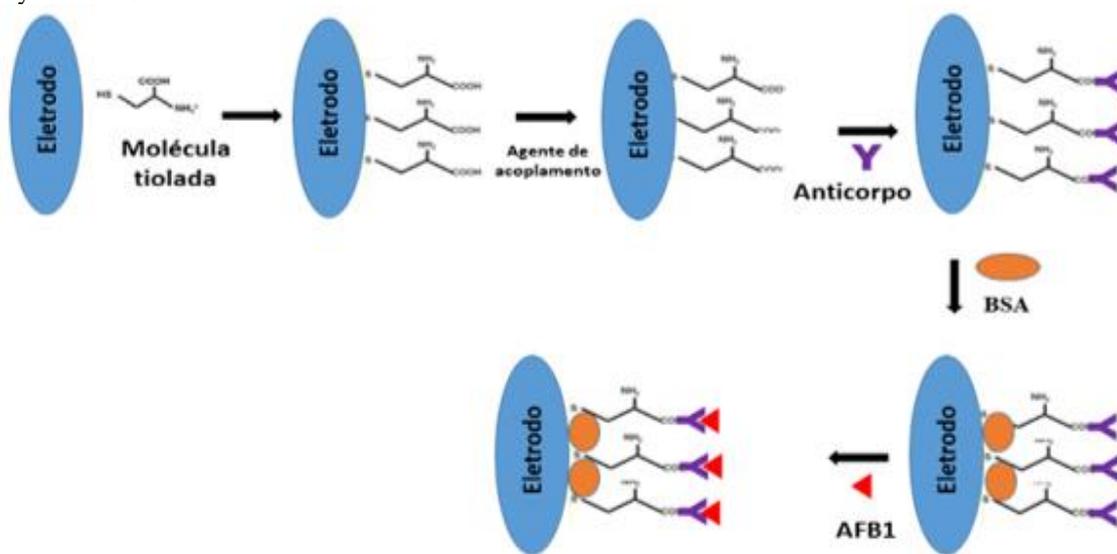
### 2.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO

O eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5mm e sonificado por 1 minuto em água deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N<sub>2</sub>). Em seguida, o eletrodo de ouro foi imerso em tampão fosfato contendo 10mM de Cys por 30 min a temperatura

ambiente para a automontagem da Cys. Posteriormente, o eletrodo modificado com Cys foi imerso numa solução aquosa de 0.4M de EDC e 0.1M de NHS numa proporção de 1:1 (Safina et al., 2008). Em seguida, o eletrodo foi modificado com NPsZnO e reagido com EDC:NHS para a ligação

do MAb. Após a obtenção do eletrodo modificado com Cys-NPsZnO-MAb (Figura 1), este sistema foi submetido a incubação com as micotoxinas de interesse (Simão et al., 2016).

Figura 1- Esquema das etapas de modificação da superfície do eletrodo de ouro para obtenção do sistema Cys-NPsZnO-MAb.

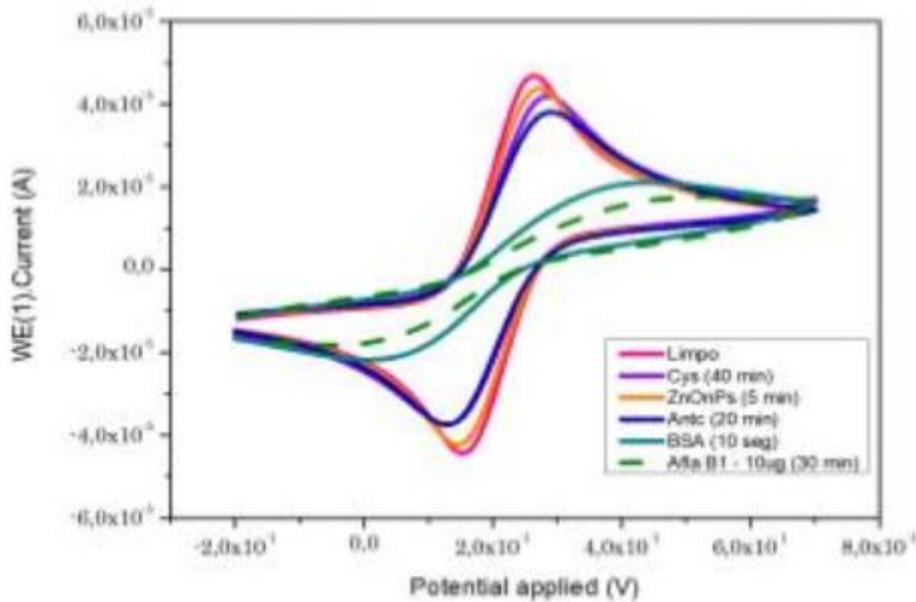


Fonte: Autor

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados obtidos na caracterização de EIS estão representados na forma de um diagrama de Nyquist e foram ajustados utilizando o software NOVA. As curvas obtidas demonstram o comportamento eletroquímico do eletrodo limpo e após a adição das camadas de Cys, NPsZnO, Anticorpo e avaliação do analito-alvo. A análise do eletrodo limpo reflete o comportamento característico de um sistema limitado por difusão.

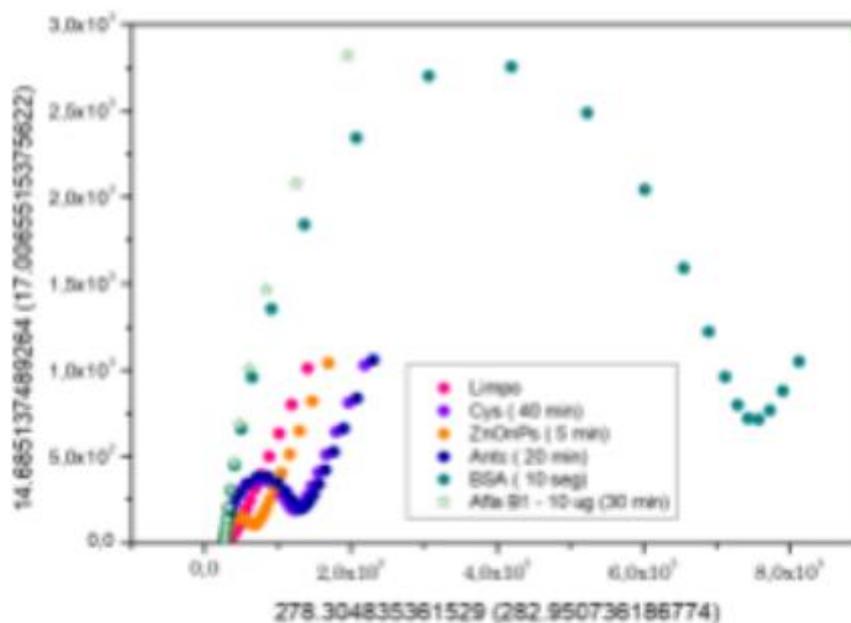
Figura 2- Gráfico de Voltametria Cíclica do processo de montagem do sensor e de avaliação da bioatividade.



Fonte: Autor

Após a adição de Cys verifica-se uma redução na magnitude das correntes de pico anódica e catódica. A característica condutora das NPsZnO foi revelada pelo aumento da condutividade da superfície eletroquímica. Após a imobilização do anticorpo foi evidenciada a manutenção da bioatividade do sistema refletida pela queda da resposta eletroquímica devido a formação do complexo anticorpo-Aflatoxina.

Figura 3 - Gráfico de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica do processo de montagem do sensor e de avaliação da bioatividade.



Na figura 3 podemos observar que análise impedimétrica corrobora com os resultados obtidos via VC. A EIE é considerada padrão ouro para sistemas biossensores. É possível observar um aumento do diâmetro do semicírculo quando o sistema foi exposto à solução de Afla B1. Este processo reflete o bioreconhecimento representado pelo aumento da resistência de transferência de carga propiciado pelo bloqueio da passagem de elétrons na superfície do eletrodo de ouro.

#### **4 CONCLUSÃO**

O sensor desenvolvido foi capaz de interagir com aflatoxina B1 e demonstra ser bastante útil na avaliação de alimentos contaminados e consequente prevenção de micotoxicoses. A associação com as NPsZnO melhora o desempenho analítico na superfície do transdutor, pois permite a um melhor trânsito de elétrons nas SAMs e favorecem a adsorção das biomoléculas na superfície eletroquímica. Portanto, o sistema desenvolvido demonstrou que o anticorpo imobilizado manteve sua bioatividade, e é uma nova alternativa para detecção de AFB1.

## REFERÊNCIAS

1. ANKLAM, Elke; STROKA, Joerg; BOENKE, Achim. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, v. 13, n. 3, p. 173-183, 2002.
2. BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, 16, 2003.
3. FINK-GREMMELS, Johanna. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants*, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008.
4. GONZÁLEZ-OSNAYA, L. et al. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. *Food Chemistry*, v. 108, n. 1, p. 272-276, 2008.
5. HOSU, Oana et al. Electrochemical immunosensors for disease detection and diagnosis. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 33, p. 4119-4137, 2018.
6. KHAN, Raju; DHAYAL, Marshal. Chitosan/polyaniline hybrid conducting biopolymer base impedimetric immunosensor to detect Ochratoxin-A. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 6, p. 1700-1705, 2009.
7. KHAN, Shams Tabrez et al. Zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress, inhibit growth, and attenuate biofilm formation activity of *Streptococcus mitis*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 21, n. 3, p. 295-303, 2016.
8. SIMÃO, Estéfani P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin B1 in Rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 6, p. 1040-1047, 2016.
9. WANG, Jianling et al. Advances in nano-scaled biosensors for biomedical applications. *Analyst*, v. 138, n. 16, p. 4427-4435, 2013.
10. WILD, Christopher P.; GONG, Yun Yun. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010.