

ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1

Estefani Pontes Simão¹; César Augusto de Souza Andrade²

¹Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: estefani_p_s@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica - CCB – UFPE. E-mail: csrandrade@gmail.com.

Sumário: Aflatoxina B1 é uma micotoxina de grande importância para a saúde pública devido ao seu potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico, apresentando um grande risco a saúde humana. No presente trabalho realizamos o estudo voltamétrico de um imunossensor para identificação de aflatoxina B1 (AFB1). Para o desenvolvimento deste sensor utilizamos o aminoácido cisteína (Cys), 1-[3-(dimetilamino) propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), anticorpo anti-AFB1 e soro albumina bovina (BSA). Para caracterização de cada etapa de desenvolvimento do imunossensor utilizamos a técnica de voltametria cíclica (VC). Utilizamos a microscopia de força atômica de (AFM) para mostrar o complexo anti-AFB1-AFB1 imobilizado sob a superfície do eletrodo. O sensor foi exposto a pequenas concentrações de AFB1 diluídas em tampão fosfato, sendo capaz de detectar a toxina como um limite de detecção de 1µg/mL, chegando a detectar até 30µg/mL, tendo em vista que a concentração máxima permitida desta toxina nos alimentos é de 20µg/mL. O imunossensor foi a exposto a ocratoxina A e não apresentou sensibilidade, demonstrando uma boa sensibilidade e especificidade a aflatoxina B1 sendo útil no controle desta micotoxina.

Palavras-chave: Aflatoxina B1; Microscopia de Força Atômica; Voltametria Cíclica.

INTRODUÇÃO

Os biossensores são dispositivos capazes de detectar rapidamente espécies químicas e/ou biológicas, tendo como objetivo a produção de um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração do analito os quais interagem com o elemento biossensível (Velascos-Garcia e Mottran, 2003). Os imunossensores eletroquímicos são um tipo de biossensor que são utilizados na detecção de biomarcadores, toxinas biológicas, análise de alimentos, meio ambiente e diagnóstico clínico (Luppa, *et al*, 2001).

Na construção de biossensores têm sido empregadas modificações químicas no eletrodo, como monocamadas automontadas (SAM), como objetivo de melhorar a transferência de elétrons, biocompatibilidade, sensibilidade e reprodutibilidade (Freire *et al*, 2003; Arya e Bhansali, 2012). O aminoácido cisteína (Cys) tem sido amplamente utilizada na obtenção de SAM devido a presença do grupo funcional sulfidril o qual possui afinidade a metais.

A técnica de VC é uma ferramenta que nos fornece informações da interface do eletrodo modificado biologicamente, permitindo deste modo o acompanhamento da taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a solução que o rodeia (Yang *et al*, 2001). A AFM é uma técnica complementar excelente para avaliar biossensores, uma vez que a resposta eletroquímica depende da morfologia, sendo assim muito útil no desenvolvimento de sensores.

As aflatoxinas (AFB) são um grupo de micotoxinas produzidas naturalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A AFB1 é a mais tóxica das AFB, sendo encontrada principalmente em amendoim e milho. Essa micotoxina apresenta propriedades carcinogênica, teratogênica, imunossupressora, sendo o seu estudo de grande interesse em garantir a saúde humana e dos animais (Lazzari, 1993).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais utilizados

Soro albumina bovina (BSA), Cys, AFB1 e anticorpo monoclonal Anti-AFB1, EDC e NHS foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Ferro-ferricianeto de potássio obtido pela VETEC (Brasil). Todos os produtos químicos e solventes eram de grau analítico, foram utilizados como recebidos sem purificação adicional.

Preparação do sistema biossensível

Inicialmente, o eletrodo de ouro foi limpo numa solução piranha, enxaguado com água ultrapura e seco a temperatura ambiente. A modificação do eletrodo de ouro foi obtida através da adição de 1 μL de Cys a 25mM diluído em tampão fosfato de sódio pH 7,4 (TFS) na superfície do eletrodo, com um tempo de adsorção de 10 minutos. Em seguida o eletrodo de ouro foi enxaguado com TFS para retirar qualquer molécula que não tenha se ligado a Cys. Subsequentemente, 1 μL da mistura de 0,4M (EDC) e 0,1M (NHS) em uma proporção de 1:1 (v / v) foi gotejada sobre a superfície do eletrodo de ouro com Cys modificado com um tempo de exposição de 10 minutos. Após isso, 1 μL da solução de anti-AFB1 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi adicionada a superfície Cys- EDC:NHS, em seguida o eletrodo foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Por fim, para bloquear qualquer sitio ativo remanescente foi adicionado 1 μL de BSA (10% p/v) a superfície do eletrodo de ouro por 10 minutos. A biointeração entre o anti-AFB1 e AFB1 foi realizada com a adição de 1 μL de AFB1 nas concentrações de 1; 2; 5; 10; 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 10 minutos. Utilizamos amostras de aflatoxina pura diluída em TFS nessas concentrações.

Medidas eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas no PGSTAT 128N potentiostato/galvanostato (Autolab, The Netherlands) com três eletrodos e uma célula eletroquímica convencional. Todos os experimentos foram realizados na presença de 10 mM de uma solução eletrolítica de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ [1:1]. A VC foi realizada em um potencial entre -0,2 e +0,7 V em uma velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} .

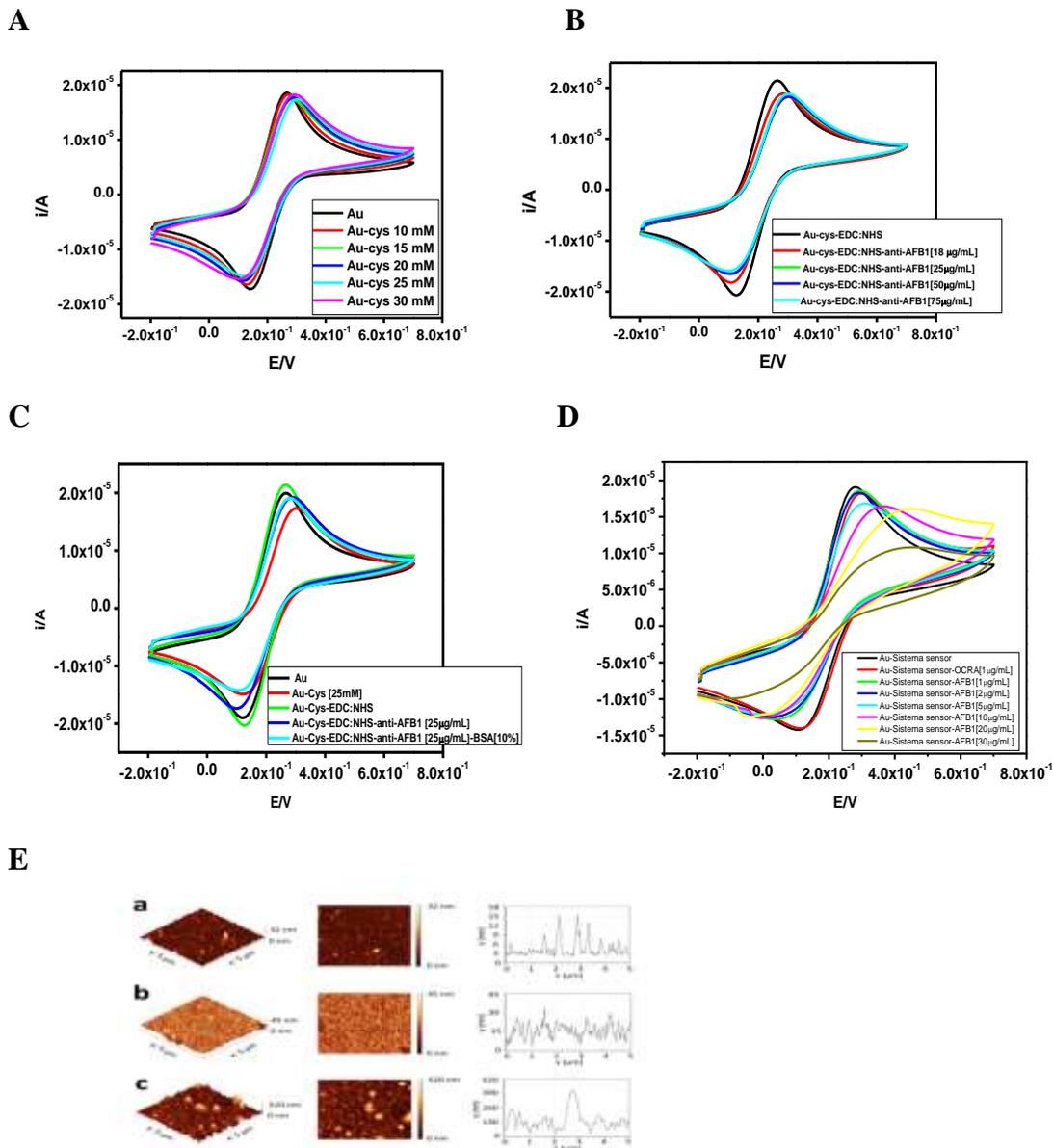
Microscopia de Força Atômica

As medidas da microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas utilizando um microscópio comercial PicoSPM II (Molecular Imaging, EUA). Consolas com uma sonda de AFM de silício (multi 75AL, NCHR, frequência de ressonância = 75 kHz, força constante = 3 Nm^{-1}) foram usadas para a AFM no modo sem contato em ar à temperatura ambiente (aproximadamente 25 ° C). Resolução lateral em 512 \times 512 pixels em uma área de leitura de 5 \times 5 μm .

RESULTADOS

Primeiramente realizamos um estudo da concentração ideal de Cys (fig. 1a), em seguida estudamos a melhor concentração de anticorpo imobilizado a essa superfície (fig.1b). Após as análises experimentais de VC definimos a concentração ideal de Cys [25mM] e anti-AFB1 [25 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Posteriormente realizamos a detecção da aflatoxina pelo imunossensor nas concentrações de 1; 2; 5; 10; 20 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o teste com o controle negativo com a Ocratoxina de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (fig.1d).

Figura 1: Voltamograma cíclico do estudo da concentração de Cy (a); estudo da concentração de anti-AFB1(b); Sistema sensor (c) e detecção da AFB1e controle negativo com Ocratoxina(d); Imagens de Microscopia de Força Atômica de cada camada do sistema senso (e).



DISCUSSÃO

A fig. 1a demonstra o voltamograma cíclico obtido com o estudo da concentração de Cys onde observamos que ocorreu uma diminuição das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc), devido ao aumento da resistência a transferência de carga conforme o aumento da concentração de Cys avaliada. Concluimos então, que a concentração de 25mM é ideal para modificação do ouro indicando um recobrimento total da superfície de ouro pela Cys, pois a partir desta concentração pode-se observar uma saturação da superfície de ouro.

Avaliamos também a concentração ideal de anti-AFB1 variando as concentrações entre 18, 25, 50 e 75 µg/mL. Nós observamos que ocorreu uma saturação a partir da concentração de 25 µg/mL, devido a uma diminuição dos picos dos voltamogramas (fig.1b) a partir desta concentração, sendo esta a concentração escolhida para o desenvolvimento da camada

sensora do imunossensor, indicando que os anti-AFB1 estão suficientemente adsorvidos para a detecção da AFB1.

Na fig.1c foi observado a diminuição nas correntes de pico (ipa e ipc) após a ligação da Cys a superfície de ouro. Posteriormente um aumento nas duas correntes de pico do voltamograma cíclico com a adição dos agentes de acoplamento de EDC e NHS, devido a substituição dos grupos carboxílicos ativados da Cys pelos ésteres de NHS na superfície do eletrodo, promovendo uma atração eletrostática com a sonda redox, facilitando a ligação do anticorpo a superfície modificada do sistema sensor. A imobilização do anti-AFB1 à superfície do eletrodo, promoveu uma diminuição nas correntes de picos ipa e ipc, o mesmo ocorreu posteriormente, com a adsorção do BSA.

Na figura 1d podemos observar a interação das diversas concentrações AFB1(1; 2; 5; 10; 20 e 30µg/mL) com o anticorpo imobilizado na plataforma desenvolvida. Observamos uma redução nos picos ipa e ipc conforme o aumento da concentração da toxina. Em adição, realizamos o teste do controle negativo com ocratoxina de 1µg/mL, demonstrando que o sensor não apresentou sensibilidade com a ocratoxina devido a uma mudança insignificante da resistência a transferência de carga.

A fig. 1e mostra a topografia da superfície do eletrodo após a modificação Cys. Pode-se ver uma camada completa e homogênea da superfície, sem a presença de agregados ou defeitos. Após a obtenção do sistema de sensor Cys- anti AFB1 é visualizado um aumento da rugosidade da superfície de 24 ± 2 nm. Imobilizado o anti AFB1 tem um visual mais globular, demonstrando a sua natureza de proteínas. Ao comparar as imagens AFM de o sistema de sensor antes e após o reconhecimento AFB1 uma diferença óbvia pode ser observada, indicando que a AFB1 com sucesso foi reconhecido.

CONCLUSÕES

O imunossensor voltamétrico desenvolvido neste trabalho apresentou uma alta seletividade para AFB1, boa sensibilidade, encurtando o tempo e diminuindo os custos dos métodos padrões utilizados na detecção da AFB1. As técnicas de VC e AFM foram de fundamental importância para o desenvolvimento de cada etapa do sensor, devido a sensibilidade e a possibilidade de avaliar e visualizar diversas interações que ocorrem entre as moléculas na superfície do eletrodo. O biossensor apresentou uma boa especificidade para a detecção da AFB1 diluída em TFS, sendo uma ótima alternativa para o monitoramento desta micotoxina.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPq e FACEPE.

REFERÊNCIAS

- ARYA, SUNIL K.; BHANSALI, SHEKHAR. Anti-Prostate Specific Antigen (Anti-PSA) Modified Interdigitated Microelectrode-Based Impedimetric Biosensor for PSA Detection. **Biosensors Journal**. v.1, p. 1-7, 2012.
- FREIRE, RENATO S.; PESSOA, CHRISTIANA A.; KUBOTA, LAURO T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quimica Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- LAZZARI, F. A. 1993. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade se sementes, grãos e rações, Curitiba: edição do autor. 140p.
- LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Imunosensors – principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. v. 314, p. 1-26, 2001.
- VELASCO-GARCIA, Maria N.; MOTTRAM, Toby. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. **Biosystems Engineering**. v. 84, n.1, p. 1-12, 2003.



YANG, W.; GOODING, J.J.; HIBBERT, D. B. Characterisation of Gold Electrodes Modified with Self Assembled Monolayers of L-Cysteine for the Adsorptive Stripping Analysis of Copper. **Journal of Electroanalytical Chemistry**.v. 516, p. 10-16, 2001.