ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOTECNOLOGIA E NANOTECNOLOGIA EM SAÚDE -
BNS04

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASENSOR BASEADO EM ÓXIDO DE ZINCO PARA DETECÇÃO DA OCRATOXINA A.

I. G. T.LIMA¹, M.P. COSTA², C. A. S. ANDRADE³, M. D. L.OLIVEIRA⁴

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica.

² Universidade Federal de Pernambuco, Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia.

^{3,4} Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica.

E-mail para contato: itala.lima2@gmail.com

RESUMO – *Este trabalho possui como principal objetivo avaliar o sistema composto por cisteína (Cys), nanotubos de carbono (NTC), nanopartículas de óxido de zinco (NpsZnO) e aptâmero (Apt) para detecção da Ocratoxina A (OTA) presente em amostras de café. A caracterização do biosistema foi realizada através das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância (EIE) para avaliar as propriedades elétricas do biosistema (CYS-NTC-NpsZnO-Apt). Os resultados demonstraram que o aptâmero foi imobilizado com sucesso na superfície do eletrodo e que o eletrodo modificado com CYS-NTC-NpsZnO-Apt foi capaz de detectar ocratoxina A em café contaminado, com limite de detecção de $1\text{pg}\cdot\text{uL}^{-1}$.*

Palavras Chaves: Micotoxinas; Óxido de zinco; Voltametria cíclica, Impedância.

ABSTRACT- *This work aims to evaluate the system composed of cysteine (Cys), carbon nanotubes (NTC), zinc oxide nanoparticles (NpsZnO) and aptamer (Apt) for detection of Ochratoxin A (OTA) present in samples of coffee. The characterization of the biosystem was performed by electrochemical techniques of cyclic voltammetry (CV) and impedance spectroscopy (IE) to evaluate the electrical properties of the biosystem (CYS-NTC-NpsZnO-Apt). The results demonstrated that the aptamer was successfully immobilized on the surface of the*

electrode and that the CYS-NTC-NpsZnO-Apt- modified electrode was able to detect ochratoxin A in coffee with a detection limit of $1\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Keywords: Mycotoxins; Zinc oxide, Cyclic voltammetry; Impedance

1. INTRODUÇÃO

Os gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, são os fungos produtores da Ocratoxina A(OTA) podendo ser encontrada em grãos como: café, cereais, cervejas, vinho e incluindo também alimentos infantis (BENITES et al., 2017; PANTELIDES et al., 2017; CAPPOZZO et al., 2017). Grande importância de saúde pública, pois ocasiona ações danosas no ser humano devido apresentar propriedades carcinogênicas, hepatotóxicas, imunossupressoras e mutagênicas (ZHU et al., 2017; GAN et al., 2017; FUSI et al., 2017; JAN et al., 2017; LOBODA et al., 2017). Atualmente é de extrema importância o desenvolvimento de um teste rápido e eficiente para a identificação da OTA ,pois as técnicas já existentes como o imunoensaio enzimático ELISA (GROSS et al., 2016), espectroscopia de massa, cromatografia líquida de alta eficiência (BUENO et al., 2015), são técnicas mais dispendiosas e demoradas, além de apresentarem alto custo de manutenção e instrumentação. Os biossensores demonstram ser excelentes candidatos para biodeteção da OTA, uma vez que, são dispositivos analíticos constituídos por duas unidades funcionais; um biorreceptor, que corresponde a um componente biológico que reconhece a substância alvo, o analito, e o transdutor, que converte a resposta biológica ou a reação bioquímica originária da interação bioespecífica em um sinal de domínio elétrico proporcional a concentração do composto detectado (Arya et al., 2012). O uso de aptâmeros (Apt) vem ganhando visibilidade no reconhecimento de diversas moléculas contaminantes, também sendo constatada sua eficiência para identificação da OTA (NGUYEN et al., 2017). Devido a intensa atração das moléculas de ácido nucléico, com as nanopartículas a serem reconhecidas, essa biointeração eficiente é decorrente da alta especificidade, promovida por suas partículas de pequenas sequências de RNA/DNA (SONG et al., 2008). Os nanotubos de carbono (NTC), apresentam boa empregabilidade na construção da plataforma pois possuem uma maior área de interação, como também alta funcionalidade e estabilidade (MAGAR., et al 2017). As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) dispõem de uma pronunciada condutividade térmica (KEDZIERSKI et al., 2017), além de serem importantes para as mais diversas aplicações na biotecnologia,

incluindo a construção de biossensores (SHARMA et al., 2015). A presença da OTA em níveis altos no café é comprovada por estudo recentes em diversos lugares do mundo

[8,13,14], sendo desta forma importante o desenvolvimento de técnicas cada vez mais precisas, rápidas e de menor custo, como é o caso dos biossensores, para evitar/reduzir impactos socioeconômicos que um alimento mundial como o café causa, se tem a produção afetada. Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de novas tecnologias de biodeteção rápida, seletiva e sensível para a detecção da Ocratoxina A.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As análises de voltametria cíclica (VC) e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N(Autolab, Eco Chemie, Holanda) numa célula convencional de três eletrodos. O eletrodo de trabalho (ET) utilizado foi de ouro modificado, o eletrodo de referência foi o de Ag/AgCl saturado com KCl e o contra-eletrodo foi o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl. As medidas foram realizadas na solução de ferro-ferricianeto de potássio $[K_4(Fe(CN)_6)/K_3(Fe(CN)_6)]$ (1:1) em tampão fosfato de sódio (TFS) a 10mM numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV (Oliveira et al., 2009, Andrade et al., 2009). As análises de voltametria cíclica foram realizadas em diferentes etapas de construção do biodispositivo, a um potencial de varredura fixo de -0,4 a 0,7 V, a temperatura (24°C) no interior de uma gaiola de Faraday.

Primeiramente, a superfície de ouro foi polida em um disco de feltro com uma suspensão de alumina e, em seguida, lavada com água deionizada e submetida à sonicação por 5 minutos para remoção de partículas residuais. Para a montagem do biossensor, o eletrodo de trabalho foi submetido a 2uL da solução de Cys (15mM) por (10 min.) em seguida ativado pela mistura de N-(3-Dimetilaminopropil)N-etilcarbodiimida (EDC):N-hidroxisuccinimida (NHS). Posteriormente adição do NTC por (20 min.),seguida da deposição do ZnO por (10 min.) sendo obtido o sistema CYS-NTC-ZnO.

Após este processo foi adicionado o sistema CYS-NTC-ZnO para imobilização o Aptamero por (30min). O biosistema CYS-NTC-ZnO-Apt foi submetido as seguintes concentrações de ocratoxina A como também do café moído (1,25,50,75 e

100pg/uL), para avaliação de sua capacidade de detecção por (30min), cada uma das concentrações posteriormente, enxaguado suavemente para separação das moléculas não reconhecidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da voltametria cíclica foram obtidas informações sobre as etapas de modificação da superfície do eletrodo de ouro. As respostas voltamétricas e impedimétricas refletem as alterações da transferência de elétrons entre o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e a superfície do eletrodo após cada processo de montagem do biossensor. Os voltamogramas demonstram que as respostas para o eletrodo de ouro limpo, eletrodo modificado com CYS; CYS-NTC-ZnO; CYS-NTC-ZnO-Apt. Apresentaram uma diminuição gradual das áreas voltamétricas e das correntes de pico catódicas (ipcat) e anódicas (ipan), com exceção quando o sistema foi exposto ao EDC:NHS, processo este que refletiu um aumento das áreas avaliadas (Fig. 1). As respostas impedimétricas (Fig. 2) estão de acordo com as análises de VC, de modo que, a redução da ipcat e ipan após cada etapa de modificação do biodispositivo, refletiu um aumento da resistência de transferência de carga (RCT). Após a formação da camada CYS-NTC-ZnO-Apt sobre o eletrodo, houve uma variação da RCT de (477 Ω) para (526 Ω), indicando a correta deposição do sistema sobre o eletrodo de ouro. Além disso, quando o biosistema foi exposto a OTA ocorreu novo incremento na RCT (561 Ω), como também frente ao café apresentando RCT (580 Ω) demonstrando a capacidade de reconhecimento biológico do sistema obtido via hibridização. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura, que demonstram a possibilidade de desenvolvimento de aptassensores eletroquímicos com nanopartículas metálicas que lideram o uso como marcadores dos processos de hibridização, (CHEN et al., 2014b; LI et al., 2014; WANG et al., 2012), também funcionam aumentando a condutividade e servindo de amplificadores indiretos do sinal produzido na interação aptâmero analito.

Figura 1- Representação gráfica do Voltamograma cíclico (A), (B) diagrama de Nyquist para as diferentes etapas de modificação do eletrodo de ouro na montagem do aptassensor.

Figura2- Representação gráfica do Voltamograma cíclico (A), (B) diagrama de Nyquist para o aptassensor frente as concentrações da ocratoxina A.

4. CONCLUSÃO

As análises de VC e EIE demonstraram o processo de adsorção/imobilização do sistema CYS-NTC-ZnO-Apt e de biointeração do sistema CYS-NTC-ZnO-Apt frente à

OTA. Pode-se concluir que o sistema CYS-NTC-ZnO-Apt apresentou uma boa resposta de RCT para o processo

de hibridização Apt-OTA. Desta forma, o aptassensor CYS-NTC-ZnO-Apt apresentou boa resposta para a detecção da OTA e poderá ser utilizado para a construção de um sistema de biodetecção rápido e sensível para a detecção da ocratoxina A.

5. REFERÊNCIAS

ARYA, S.K., SAHAB, S., RAMIREZ-VICKC, J. E., GUPTA, V., BHANSALIDS., SINGH, P. *Anal. Chim. Acta* 737 (2012) 1.

(BENITES, A. J., FERNANDES, M., BOLETO, A. R., AZEVEDO, S., SILVA, S., & LEITÃO, A. L. (2017). Occurrence of ochratoxin A in roasted coffee samples commercialized in Portugal. *Food Control*, 73, 1223-1228.

BUENO, C. C., GARCIA, P. S. & STEFFENS, C. (2015). *Grandes áreas da nanociência e suas aplicações. Nanossensores*, 5(2), 147-187.

CAPPOZZO, J., JACKSON, L., LEE, H. J., ZHOU, W., AL-TAHER, F., ZWEIGENBAUM, J., & RYU, D. (2017). Occurrence of Ochratoxin A in Infant Foods in the United States. *Journal of Food Protection*, 80(2), 251-256.

FUSI, E., GIROMINI, C., REBUCCI, R., PINOTTI, L., CAPRARULO, V., CHELI, F., ... & BALDI, A. (2017). Ochratoxin A cytotoxicity on Madin–Darby canine kidney cells in the presence of alpha-tocopherol: Effects on cell viability and tight junctions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.

GAN, F., ZHOU, Y., HOU, L., QIAN, G., CHEN, X., & HUANG, K. (2017). Ochratoxin A induces nephrotoxicity and immunotoxicity through different MAPK signaling pathways in PK15 cells and porcine primary splenocytes. *Chemosphere*, 182, 630-637.

GROSS, M., ASAM, S., & RYCHLIK, M. (2017). Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the mycotoxin tenuazonic acid in sorghum grains and sorghum-based infant food. *Mycotoxin research*, 33(1), 75-78.

KEDZIERSKI, M. A., BRIGNOLI, R., QUINE, K. T., & BROWN, J. S. (2017). Viscosity, density, and thermal conductivity of aluminum oxide and zinc oxide nanolubricants. *International Journal of Refrigeration*, 74, 1-9.

LOBODA, A., STACHURSKA, A., PODKALICKA, P., SOBCZAK, M., MUCHA, O., WITALISZ-SIEPRACKA, A., & DULAK, J. (2017). Effect of heme oxygenase-1 on ochratoxin A-induced nephrotoxicity in mice. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 84, 46-57.

PANTELIDES, I. S., ARISTEIDOU, E., LAZARI, M., TSOLAKIDOU, M. D., TSALTAS, D., CHRISTOFIDOU, M., & IOANNOU, N. (2017). Biodiversity and Ochratoxin A profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from wine grapes in Cyprus vineyards. *Food Microbiology*.

SHARMA, R., RAGAVAN, K. V., THAKUR, M. S., & RAGHAVARAO, K. S. M. S. (2015). Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 612-627.

ZHU, L., ZHANG, B., DAI, Y., LI, H., & XU, W. (2017). A Review: Epigenetic Mechanism in Ochratoxin A Toxicity Studies. *Toxins*, 9(4), 113.

WANG, Y., J FENG., Z TAN., H. WANG. Electrochemical impedance spectroscopy aptasensor for ultrasensitivedetection of adenosine with dual backfillers. *Biosensors & bioelectronics*, v. 60, p.218–23, 15 out. 2014.

6. AGRADECIMENTOS

FACEPE, CNPq e BIONANO.