



DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PLATAFORMA NANOAPTASSENSORA (MWCNT-COOH/ÁCIDO POLIXANTURÊNICO) PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINA B1

Lucas M. F. Barros¹; Sarah K. M. C. R. Lima¹; Jéssica C. Silva²; Jailson S. Silva³; Phabyanno R. Lima⁴

¹ Instituto Federal de Alagoas, Campus Maceió, Avenida do Ferroviário, 530 - Maceió/AL - 57020-600

² Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Tabuleiro do Martins, Maceió/AL - 57072-970

³ Escola Municipal Democrático Sarmento, Av. Dr. Fernando Sarmento, 33 São Luís do Quitunde/AL - 57920-000

⁴ Instituto Federal de Alagoas, Campus Marechal Deodoro, R. Lourival Alfredo, 176 - MD/AL - 57.160-000
lmfb2@aluno.ifal.edu.br

Palavras-Chave: Micotoxina, Aptassensor, Eletrodo Impresso

Introdução

A contaminação de alimentos por micotoxinas representa um dos principais desafios para a segurança alimentar mundial, devido aos impactos na saúde pública, às perdas econômicas e às restrições ao comércio internacional (Eskola et al., 2020). Entre essas substâncias, a aflatoxina B1 (AFB1), produzida principalmente por espécies de *Aspergillus*, destaca-se pela elevada ocorrência em grãos, cereais, oleaginosas e seus derivados, além do reconhecido potencial hepatocarcinogênico, mutagênico e imunossupressor. Em razão desses efeitos, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica a AFB1 como carcinógeno do Grupo 1, reforçando a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, seletivos e aplicáveis ao monitoramento da qualidade e segurança dos alimentos (IARC, 2012; Guo; Wang, 2024).

A determinação de AFB1 é tradicionalmente realizada por técnicas cromatográficas e imunológicas, como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS), cromatografia líquida com detector de fluorescência (HPLC-FLD) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reconhecidas pela elevada sensibilidade e confiabilidade. Entretanto, essas metodologias demandam preparo criterioso das amostras, infraestrutura laboratorial especializada, elevado custo operacional e longos tempos de análise, limitando sua aplicação em monitoramentos rápidos e descentralizados (Doddanagowada et al., 2024). Nesse contexto, biossensores eletroquímicos vêm se consolidando como alternativas promissoras por aliarem rapidez, portabilidade, baixo custo, possibilidade de miniaturização e elevada sensibilidade analítica (Guo; Wang, 2024; Ciobanu et al., 2024).

Entre essas plataformas, os aptassensores eletroquímicos destacam-se por utilizarem aptâmeros como elementos de reconhecimento molecular, proporcionando elevada afinidade e seletividade pelo analito-alvo, além de vantagens relacionadas à estabilidade química,



facilidade de síntese e custo de produção em comparação aos anticorpos (Li et al., 2024; Zhang et al., 2024). O desempenho desses dispositivos pode ser significativamente ampliado pela incorporação de nanomateriais condutores. Dentre eles, os nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxílicos (MWCNT-COOH) apresentam elevada área superficial, excelente condutividade elétrica e grupos funcionais capazes de favorecer sua dispersão e fornecer sítios reativos para a interação com biomoléculas, contribuindo para maior estabilidade da interface eletrodo/bioreceptor e eficiência na transferência de elétrons (Shafi et al., 2024).

Paralelamente, a incorporação de espécies redox eletroativas imobilizadas à superfície do eletrodo tem se mostrado uma estratégia eficiente para simplificar a arquitetura de biossensores e aumentar sua sensibilidade analítica. Nesse contexto, o ácido xanturênico destaca-se como uma molécula eletroativa capaz de originar espécies poliméricas redox-ativas, como o ácido poli-xanturênico, na superfície do eletrodo, permitindo a geração de sinais eletroquímicos intrínsecos à plataforma e atuando como mediador de transferência eletrônica (Silva et al., 2010). Essa característica possibilita o monitoramento das etapas de modificação do eletrodo e amplia as estratégias de construção de plataformas eletroquímicas mais simples e eficientes. Embora diversos aptassensores para AFB1 tenham sido descritos, plataformas que integrem MWCNT-COOH, ácido xanturênico e aptâmeros específicos em eletrodos impressos de carbono permanecem pouco exploradas, evidenciando uma oportunidade para o desenvolvimento de dispositivos analíticos mais simples, sensíveis e reprodutíveis.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um aptassensor eletroquímico baseado em eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxílicos, ácido xanturênico e aptâmero específico para aflatoxina B1. A arquitetura proposta busca reunir elevada sensibilidade, seletividade, estabilidade e reprodutibilidade, contribuindo para o desenvolvimento de uma plataforma analítica de baixo custo e com potencial aplicação no monitoramento da segurança de alimentos.

Material e Métodos

O aptassensor eletroquímico foi desenvolvido utilizando eletrodos impressos de carbono (SPE, modelo DS110, DropSens) modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxílicos (MWCNT-COOH). Inicialmente, uma dispersão de MWCNT-COOH em N,N-dimetilformamida (DMF) foi preparada e depositada sobre a superfície do eletrodo de trabalho, modificando a superfície do eletrodo, promovendo a formação da camada condutora da plataforma de carbono do eletrodo. Em seguida, os eletrodos modificados foram submetidos à eletropolimerização do ácido xanturênico (AX) em solução de tampão fosfato (PBS, pH 5,5), empregando voltametria cíclica na faixa de potencial de $-0,5$ a $1,0$ V (vs. Ag), durante 15 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , visando à geração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo.



Posteriormente, os grupos carboxílicos presentes na plataforma foram ativados utilizando N-hidroxissuccinimida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), possibilitando a imobilização covalente do aptâmero específico para aflatoxina B1 (AFB1). As condições de eletropolimerização do AX (pH e velocidade de varredura), bem como a concentração e o procedimento de imobilização do aptâmero, foram previamente otimizados visando maximizar a resposta eletroquímica da plataforma.

As análises eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT-30 (Autolab Eco Chemie, Utrecht, Holanda), controlado pelo software NOVA 1.10, empregando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial em um sistema de três eletrodos integrado ao SPE. Cada etapa de construção do aptassensor foi monitorada por voltametria cíclica, permitindo acompanhar as modificações sucessivas da interface eletródica.

O desempenho analítico da plataforma foi investigado após incubação com diferentes concentrações de AFB1 por meio da construção da curva analítica, determinação da sensibilidade, dos limites de detecção e de quantificação, além da avaliação da seletividade frente à micotoxina ocratoxina A e da estabilidade do dispositivo durante o período de armazenamento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Resultados e Discussão

A construção do aptassensor foi acompanhada por voltametria cíclica, permitindo monitorar as modificações eletroquímicas decorrentes de cada etapa de funcionalização da plataforma (Figura 1). A eletropolimerização do ácido xanturênico sobre o eletrodo previamente modificado com MWCNT-COOH resultou no aparecimento de um par de picos redox bem definido, confirmando a formação da espécie eletroativa responsável pela transdução do sinal analítico. As etapas subsequentes de ativação da superfície, imobilização do aptâmero e incubação com a AFB1 promoveram alterações progressivas nos perfis voltamétricos, evidenciadas pela diminuição das correntes de pico e pelo deslocamento dos potenciais de oxidação e redução para valores mais catódicos, comportamento característico da modificação sucessiva da interface eletródica e da formação do complexo aptâmero–AFB1. Esses resultados confirmam o mecanismo de detecção do tipo *signal-off*, no qual o reconhecimento molecular dificulta a transferência de elétrons na superfície do eletrodo. Além disso, demonstram que o ácido xanturênico eletropolimerizado atuou de forma eficiente como mediador redox intrínseco, permitindo monitorar o processo de reconhecimento molecular diretamente pela resposta eletroquímica da plataforma, sem a necessidade da utilização de sondas redox adicionadas ao eletrólito, característica que representa um diferencial em relação à maioria dos aptassensores eletroquímicos descritos para a determinação de AFB1.

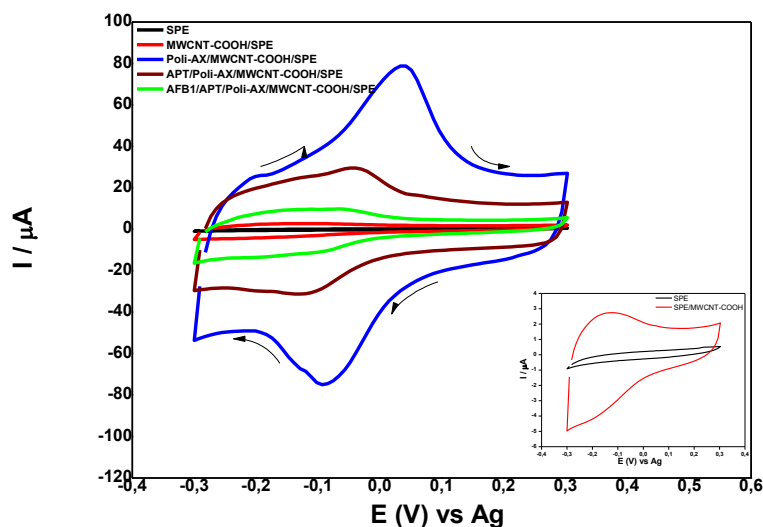


Figura 1: Voltamogramas cíclicos das etapas de modificação da superfície do biossensor. SPE sem modificação (linha preta), SPE modificado com MWCNT-COOH (linha vermelha), SPE modificado com MWCNT-COOH e AX (linha azul), SPE modificado com MWCNT-COOH, AX e APT (linha marrom), SPE modificado com MWCNT-COOH, AX, APT e AFB1 (linha verde). Condições experimentais: Faixa de potencial de -0,3 a 0,3 V, Solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$

Após a confirmação da construção da plataforma, foram avaliados os principais parâmetros capazes de influenciar o desempenho do aptassensor. A eletropolimerização do ácido xanturênico foi inicialmente investigada em diferentes valores de pH, sendo observado melhor desempenho em pH 7,0. Nessa condição, obteve-se maior definição do par redox e melhor estabilidade da resposta eletroquímica, indicando condições mais favoráveis para a formação da espécie eletroativa responsável pela transdução do sinal. Além disso, a escolha desse pH favorece a detecção da AFB1, uma vez que, nessa faixa, coexistem as formas estruturais mais relevantes da molécula em solução, contribuindo para um reconhecimento molecular mais eficiente.

A influência da velocidade de varredura sobre a resposta eletroquímica é apresentada na Figura 2. O aumento da velocidade promoveu incremento proporcional das correntes de pico, mantendo a definição do par redox do ácido xanturênico e evidenciando a estabilidade da plataforma. A relação linear observada entre a corrente de pico e a velocidade de varredura indica que a espécie eletroativa gerada a partir do ácido xanturênico permanece adsorvida sobre a superfície do eletrodo, característica desejável para mediadores redox imobilizados e que contribui para a reprodutibilidade da resposta eletroquímica.

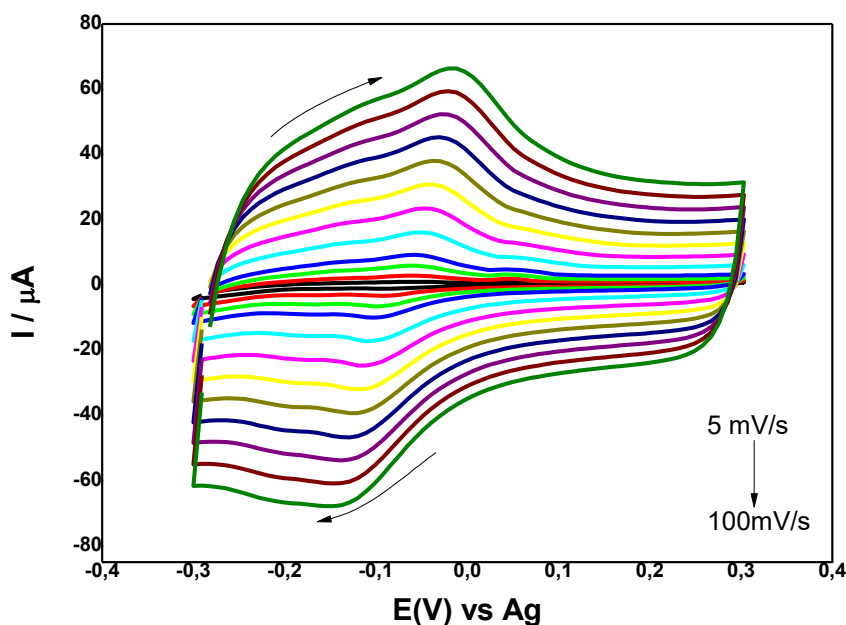


Figura 2: Voltamogramas cíclicos de APT/Poli-AX/MWCNT-COOH/SPE em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura.

A concentração do aptâmero também exerceu influência significativa sobre o desempenho do dispositivo, sendo selecionada a concentração de 0,10 nmol L⁻¹, que proporcionou elevada resposta eletroquímica utilizando quantidade de bioreceptor substancialmente inferior à empregada na maioria dos aptassensores descritos na literatura. Esse resultado evidencia a elevada eficiência da plataforma proposta e representa uma vantagem adicional do dispositivo desenvolvido.

O desempenho analítico do aptassensor foi avaliado por voltametria cíclica, apresentando diminuição progressiva da corrente de pico com o aumento da concentração de AFB1, característica do mecanismo de detecção do tipo *signal-off*. A plataforma apresentou resposta linear entre 0,10 e 0,80 nmol L⁻¹ ($R^2 = 0,991$), com faixa de determinação de 0,10 a 6,40 nmol L⁻¹, evidenciando saturação da superfície do aptassensor para concentrações superiores a 0,80 nmol L⁻¹. A sensibilidade obtida foi de $-25,06 \mu\text{A L mol}^{-1}$, com LOD de 0,03 nmol L⁻¹ e LOQ de 0,10 nmol L⁻¹. Esses resultados demonstram elevada sensibilidade e reprodutibilidade da plataforma, apresentando desempenho analítico competitivo em relação aos aptassensores eletroquímicos descritos na literatura.

A avaliação do desempenho analítico do aptassensor desenvolvido em comparação com plataformas descritas na literatura encontra-se na Tabela 1.



Tabela 1: Desempenho de AFB1/APT/Poli-AX/MWCNT-COOH/SPE frente a outros sensores.

Referência	Plataforma do aptassensor	Técnica eletroquímica	Faixa linear	Limite de detecção (LOD)
Este trabalho	SPE / MWCNT-COOH / Poli-AX	VC	0,10–6,40 nmol L ⁻¹	0,03 nmol L ⁻¹
Wang et al. (2022)	COOH-GO/COOH-MWNT/pDA/AuNPs sobre SPE	VC/EIS	0,1 fg mL ⁻¹ – 100 pg mL ⁻¹	15,16 ag mL ⁻¹
Jahangiri-Dehaghani et al. (2022)	AuNPs sobre nanosfolhas de Ni-MOF com aptâmero AFB1 e marcador p-bifenol	VC/EIS /VPD	5,0 × 10 ⁻³ – 150 ng mL ⁻¹	1,0 × 10 ⁻³ ng mL ⁻¹
Fan et al. (2022)	UiO-66(Zr)-(COOH) ₂ associado a DNA walker e tetraferroceno	Deteção eletroquímica amplificada	0,1 pg mL ⁻¹ – 0,195 µg mL ⁻¹	4,8 fg mL ⁻¹

Observa-se que os sistemas descritos na literatura alcançam baixos limites de detecção. Entretanto, essas abordagens geralmente envolvem maior complexidade de fabricação e etapas adicionais de modificação da superfície sensora. Nesse contexto, o aptassensor desenvolvido neste trabalho apresentou desempenho analítico competitivo, associado a uma plataforma simplificada reforçando o potencial do aptsensor como uma alternativa sensível e de construção simplificada para a determinação eletroquímica de AFB1.

Conclusões

Foi desenvolvido um aptassensor eletroquímico para detecção de aflatoxina B1 (AFB1) baseado em eletrodo impresso de carbono (SPE) modificado com MWCNT-COOH e ácido xanturênico. A modificação proposta contribuiu para a obtenção de uma plataforma eletroquímica adequada para o reconhecimento do analito, associando as propriedades condutoras dos nanotubos de carbono à funcionalidade do ácido xanturênico na construção do sensor. O sistema desenvolvido apresentou faixa linear de 0,10–6,40 nmol L⁻¹ e limite de detecção de 0,03 nmol L⁻¹, utilizando voltametria cíclica como técnica de monitoramento. A comparação com sistemas descritos na literatura demonstrou desempenho analítico competitivo, considerando a simplicidade da plataforma frente a outros trabalhos com estratégias de amplificação e materiais mais complexos. Dessa forma, o aptassensor SPE/MWCNT-COOH/Poli-AX apresenta potencial como uma plataforma eletroquímica alternativa para a detecção de AFB1.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, à FAPEAL e ao IFAL pelo apoio financeiro, pela concessão de bolsas de estudo e pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.



Referências

- CIOBANU, D.; HOSU-STANCIOIU, O.; MELINTE, G.; OGNEAN, F.; SIMON, I.; CRISTEA, C. Recent Progress of Electrochemical Aptasensors toward AFB₁ Detection (2018–2023). **Biosensors**, v. 14, n. 1, p. 7, 2024.
- DODDANAGOWADA, S.; PALAKOLLU, P. V. N.; VATTIKUTI, S. V. P.; SHIM, J.; MAMEDA, N. Recent Progress, Challenges and Future Perspectives of Electrochemical Biosensing of Aflatoxins. **Microchimica Acta**, v. 192, p. 17, 2024.
- ESKOLA, M.; KOS, G.; ELLIOTT, C. T.; HAJŠLOVÁ, J.; MAYAR, S.; KRSKA, R. Worldwide Contamination of Food-Crops with Mycotoxins: Validity of the Widely Cited FAO Estimate of 25%. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2773–2789, 2020.
- GUO, X.; WANG, M. Recent Progress in Optical and Electrochemical Aptasensor Technologies for Detection of Aflatoxin B₁. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 33, p. 13093–13111, 2024.
- IARC. Chemical Agents and Related Occupations. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 100F. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012.
- LI, Y.; ZHANG, D.; ZENG, X.; LIU, C.; WU, Y.; FU, C. Advances in Aptamer-Based Biosensors for the Detection of Foodborne Mycotoxins. **Molecules**, v. 29, n. 16, p. 3974, 2024.
- SHAFI, S.; KHAN, M. S.; ET AL. Functionalized Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensing Applications: Recent Advances and Future Perspectives. **Microchemical Journal**, v. 205, p. 111742, 2024.
- SILVA, F. A. S.; LOPES, C. B.; COSTA, E. O.; LIMA, P. R.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F. Polyanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 450–454, 2010.
- ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, H.; et al. Recent Advances in Nucleic Acid Signal Amplification-Based Aptasensors for Sensing Mycotoxins. **Chemical Communications**, v. 60, 2024.
- WANG, P.; LUO, B.; LIU, K.; WANG, C.; DONG, H.; WANG, X.; HOU, P.; LI, A. A novel COOH–GO–COOH–MWNT/pDA/AuNPs based electrochemical aptasensor for detection of AFB₁. **RSC Advances**, v. 12, p. 27940–27947, 2022.
- JAHANGIRI-DEHAGHANI, F.; ZARE, H. R.; SHEKARI, Z.; BENVIDI, A. Development of an electrochemical aptasensor based on Au nanoparticles decorated on metal-organic framework nanosheets and p-biphenol electroactive label for the measurement of aflatoxin B₁ in a rice flour sample. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, p. 1973–1985, 2022.
- FAN, H.; CHENG, M.; ZHANG, W.; HONG, N.; WEI, G.; HUANG, T.; CUI, H.; ZHANG, J. A self-powered and reagent-less electrochemical aptasensor based on a DNA walker and tetraferrocene for the detection of aflatoxin B₁. **Analytical Methods**, v. 14, p. 3686–3693, 2022.