

**MÉTODO PARA A FABRICAÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO,
IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO E SEU USO**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo da eletroquímica, e refere-se a um sistema de detecção de Ocratoxina A em diferentes matrizes de alimentos e amostras ambientais, baseado no uso de anticorpos como elemento de reconhecimento e na impedância eletroquímica como sistema de detecção.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e tem sido encontrada principalmente em cereais e em outros produtos como café, vinho, frutas secas, cerveja e suco de uva. Devido à sua toxicidade, os níveis máximos aceitáveis de micotoxinas são padronizados e a verificação de sua ocorrência nos alimentos é fundamental para garantir a segurança alimentar e a proteção dos consumidores. Esses efeitos tóxicos variam de acordo com a estrutura química, a dose e o tempo de exposição.

[003] A OTA pode sobreviver à erradicação de fungos hospedeiros e exibe uma meia-vida incomumente longa de 35 dias no corpo humano (STUDER-ROHR *et al.*, 2000). Esta molécula tem efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos e teratogênicos, e foi classificada como possível carcinógeno pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, 1993). Além disso, foi relatado que a OTA afeta a inibição/ativação de enzimas na síntese de proteínas, apoptose, imunossupressão, alteração nas atividades das células imunológicas, modulação da produção de citocinas e

atua como desregulador endócrino (IARC. 1993; MALIR *et al.*, 2013; CREPPY *et al.*, 1983; ASSAF *et al.*, 2004; BOORMAN *et al.*, 1984; MÜLLER *et al.*, 2003; LEA *et al.*, 1989).

[004] De uma forma geral, a análise de OTA em grãos e alimentos é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, normalmente associada à espectrometria de massas. Consiste em uma técnica muito sensível e segura, no entanto, requer pré-tratamento laborioso e elevados custos de análise para monitoramento em larga escala. Existe ainda o ensaio imunoenzimático muito abrangente e bastante disseminado, o ELISA, porém, o procedimento é demorado, não é ideal para testes de campo e requer leitores de placa especializados. Nesse ínterim, diferentes tipos de biossensores têm sido desenvolvidos com variadas estratégias de detecção, principalmente utilizando transdutores ópticos (MYNDRUL *et al.*, 2018; VITER *et al.*, 2018; ADÁNYI *et al.*, 2007; ALARCON *et al.*, 2006) e sistemas eletroquímicos (MUCHINDU *et al.*, 2011; BADEA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2009; KARCZMARCZYK *et al.*, 2017).

[005] A maioria destes biossensores são baseados no uso de anticorpos como elementos de reconhecimento. Os anticorpos são um dos biorreceptores mais importantes para direcionar analitos específicos, aproveitando a interação não covalente altamente específica. A imobilização de anticorpos normalmente envolve o uso de monocamadas auto-organizadas (SAMs), visto que a adsorção passiva promove orientação aleatória, desnaturação, necessidade de maior quantidade de anticorpos e uma fraca reprodutibilidade. Para aumentar a possibilidade de ligação anticorpo-antígeno e, portanto, a sensibilidade de um imunossensor, o anticorpo

pode ser imobilizado em um local específico em vez de uma orientação aleatória. O acoplamento covalente é uma estratégia bem explorada e apresenta a vantagem de manter a estrutura terciária do anticorpo e de minimizar possíveis efeitos negativos sobre as propriedades após a conjugação. Um método que tem se mostrado bem eficiente envolve a utilização de um agente de ligação cruzada de comprimento zero, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e o NHS (N-Hidroxisuccinamida), para a formação de ligações amida entre grupos carboxílicos dos ligantes e as aminas primárias dos anticorpos.

[006] O primeiro imunoensaio para Ocratoxina A foi realizado por Radioimunoensaio (RIA) usando anticorpos policlonais. A OTA-IgG bovina foi o imunógeno de escolha para produzir anticorpos e o radioisótopo Iodo-125 foi utilizado como traçador. O limite de detecção foi de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, o que é bastante alto (AALUND *et al.*, 1975). Houve progressos significativos na diminuição dos limites de detecção com RIA, no entanto, devido aos riscos à saúde de compostos radiomarcados e descarte especializado de resíduos, o RIA não está em uso há muito tempo. Métodos imunoquímicos avançados incluíram vários marcadores alternativos e, recentemente, até métodos livres de rótulos.

[007] A substituição de radionuclídeos por enzimas em combinação com um substrato cromógeno possibilitou alternativas bem-sucedidas em sistemas de detecção com transdutores ópticos, como o ELISA. Destaque também para a utilização de fluoróforos, que proporcionou uma melhor sensibilidade, possibilidade de projetar ensaios multiplex e até mesmo imunoensaios homogêneos, evitando etapas de

lavagem e separação. Um exemplo disso é o imunoensaio proposto por KREISSIG *et al.*, 2011. Tal ensaio usa transferência de energia de estado excitado (FRET). Tanto o marcador quanto o anticorpo são marcados com uma etiqueta fluorescente, um doador e um aceptor, respectivamente. Quando ocorre a ligação, a fluorescência é extinta, mas o deslocamento pelo composto alvo elimina essa extinção e a fluorescência pode ser medida.

[008] Diversas técnicas baseadas em SPR (Surface Plasmons Resonance) já foram desenvolvidas para detecção de OTA, tendo inclusive dispositivos comerciais como o da *Biocore* (Suécia) e o *Spreeta* (Texas Instruments). Outros avanços importantes para imunodetecção de OTA incluem os testes imunocromatográficos, com detecção simples, rápida e de baixo custo. No entanto, as detecções livres de equipamento são apenas qualitativas ou semiquantitativas e sofrem na maioria das vezes interferência da coloração da matriz.

[009] Dependendo do número de etapas e custos, os imunossensores eletroquímicos apresentam um grande potencial para identificação e quantificação de diversos tipos de espécies químicas de interesse (analitos) em diferentes tipos de amostras biológicas e ambientais. Esta técnica pode ser subdividida em amperométrica, potenciométrica, condutométrica e impedimétrica, tendo recebido amplo reconhecimento e interesse devido a sensibilidade, construção simples, viabilidade de miniaturização e baixo custo.

[010] Ao contrário dos sistemas amperométricos e potenciométricos, os biossensores baseados na espectroscopia

de impedância eletroquímica (EIS) são livres de rótulos e não dependem de nenhuma enzima específica para a detecção do analito. A detecção pode ser realizada pela alteração na resistência de transferência de carga na região de superfície ativa do eletrodo causada pela ligação ou complexação do analito de interesse. Enquanto EIS fornece alta sensibilidade, interações anticorpo-antígeno contribuem para alta especificidade e seletividade. A combinação dos dois garante que as plataformas de detecção de imunoenaios baseadas em EIS sejam adequadas para a detecção ultrasensível de microcontaminantes em diferentes matrizes. Para avaliar a impedância de um sistema eletroquímico em biossensores faradaicos, a superfície modificada do eletrodo biossensor é imersa em uma solução contendo um mediador de elétrons. Os pares redox mais comumente usados incluem ferricianeto/ferrocianeto, hexaamminerutênio (II/III) e ferroceno. Em circuitos não faradaicos, a impedância é medida sem um mediador redox.

ESTADO DA TÉCNICA

[011] Alguns imunossensores eletroquímicos para OTA já foram publicados. Liu e colaboradores utilizaram um ensaio competitivo utilizando um eletrodo de ouro modificado com nanopartículas de ouro conjugadas com OTA-ovalbumina. Após a competição do anticorpo monoclonal anti-OTA com o analito OTA da amostra, um anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina foi ligado seletivamente à superfície do eletrodo, proporcionando um indicador para a concentração de OTA na amostra (LIU *et al.*, 2009). A resposta eletroquímica decorrente da oxidação do produto enzimático foi inversamente proporcional à concentração de OTA na faixa de

10 pg.mL⁻¹ a 100 ng. mL⁻¹ com um limite de detecção tão baixo quanto 8,2 pg.mL⁻¹. No trabalho publicado por WANG *et al.*, 2019 foi desenvolvido um aptassensor eletroquímico com amplificação de sinal por meio de uma exonuclease e relataram uma faixa linear de detecção de OTA de 10 pg.mL⁻¹ a 10 ng.mL⁻¹ e LOD de 3 pg.mL⁻¹.

[012] No documento CN108181371A é descrita a invenção de um método eletroquímico de detecção da Ocratoxina A em alimentos, que inclui as instruções para tratamento e polimento dos eletrodos de trabalho, preparação do eletrodo modificado com alceno e fósforo preto, construção da curva padrão de OTA correlacionando corrente elétrica e pico redox, assim como a análise quantitativa do analito em amostras reais.

[013] O documento KR20150118848A descreve um método de detecção subnanomolar de ocratoxina A usando nanopartículas de prata conjugadas com aptâmeros e utilizando o efeito SERS/Raman. De acordo com a referida invenção, a presença da toxina promove uma agregação dos nanomateriais plasmônicos sendo possível a identificação quantitativa do analito comparando-se o sinal Raman com uma amostra controle.

[014] O documento CN113884556A descreve a preparação de um sensor eletroquímico para detecção de ocratoxina A. O sistema compreende a fabricação de um nanocompósito bimetalico conjugado com aptâmeros ligados covalentemente à superfície de um eletrodo de trabalho. Foi relatado que o método tem as vantagens de alta velocidade de resposta, baixos limites de detecção, alta sensibilidade, boa repetibilidade e alta precisão.

[015] O documento US20160341722A1 descreve um

imunossensor eletroquímico livre de rótulos para detecção sensível de analitos diversos. O biossensor é um eletrodo impresso em tela de nanofibra de carbono modificado com um filme de carboxifenil e então ativado por EDC/NHS. Além disso, uma monocamada de revestimento de ácido 4-aminofenilborônico foi adicionada no eletrodo para permitir a orientação do anticorpo por meio da ligação da porção de oligossacarídeo-sacarídeo de ácido borônico localizada na região Fc do anticorpo. A detecção do hormônio somatotropina bovina (rbST) usado como modelo obteve um limite de detecção de 1 pg. mL⁻¹.

[016] O documento em nome de KUNENE *et al.*, intitulado HIGHLY-EFFICIENT ELECTROCHEMICAL LABEL-FREE IMMUNOSENSOR FOR THE DETECTION OF OCHRATOXIN A IN COFFEE SAMPLES, refere-se à fabricação e caracterização de um imunossensor eletroquímico para a detecção seletiva de Ocratoxina A (OTA) em amostras de café. O imunossensor apresentou excelentes desempenhos eletroquímicos, como uma ampla faixa de detecção de 0,5-20 ng mL⁻¹ e um LOD de 0,096 ng mL⁻¹ para a detecção de OTA. Entretanto, neste documento, o processo de fabricação e a maneira de leitura são diferentes. Trata-se de um eletrodo de carbono modificado com nanopartículas de paládio com múltiplas etapas experimentais. Não há uso de ligantes para orientação, apenas ativação de grupos orgânicos. A detecção é realizada por voltametria cíclica.

[017] O documento em nome de MALVANO *et al.*, intitulado LABEL-FREE IMPEDIMETRIC BIOSENSORS FOR THE CONTROL OF FOOD SAFETY - A REVIEW, faz uma review sobre a crescente demanda em tecnologias de biossensores como dispositivos analíticos simples, rápidos, precisos, de baixo custo e portáteis para

o monitoramento e detecção de contaminantes químicos e microbiológicos (toxinas, micotoxinas, bactérias patogênicas, pesticidas e alérgenos), dentre elas, a Ocratoxina A, e afirmam que biossensores label-free parecem ser os dispositivos mais promissores para o futuro. Além disso, mencionam que a aplicação da técnica impedimétrica como uma tecnologia de transdução permitiu a detecção sem marcação e a quantificação sensível da biointeração em diferentes aplicações e, portanto, também para o desenvolvimento de biossensores de perigos alimentares. Entretanto, tal documento não traz elementos que antecipam a presente invenção em relação à construção do biossensor, como superfície química, modificações, componentes ou biomoléculas, apenas direcionamentos para as técnicas de impedância eletroquímica como promissora para Label free detection.

[018] O documento em nome de MALVANO *et al.*, intitulado IMPEDIMETRIC LABEL-FREE IMMUNOSENSOR ON DISPOSABLE MODIFIED SCREEN-PRINTED ELECTRODES FOR OCHRATOXIN A, refere-se ao desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico label-free em eletrodos de carbono impressos em tela descartáveis (SPCE) para determinação quantitativa de ocratoxina A (OTA). Após a modificação da superfície do SPCE com nanopartículas de ouro (AuNPs), o anti-OTA foi imobilizado no eletrodo de trabalho através de uma camada de cisteamina, sendo as superfícies modificadas caracterizadas por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Entretanto, nesse documento o processo de fabricação é diferente. Trata-se de um eletrodo de carbono impresso constituído de grafite, cloreto de prata e tinta isolante, com redução de nanopartículas de ouro na

superfície do eletrodo por deposição eletroquímica. A ativação de grupos é realizada com glutaraldeído e bloqueio de sítios com etanolamina. A configuração do eletrodo e a modificação química da superfície é distinta da presente invenção.

[019] O documento em nome de MALVANO *et al.*, intitulado IMPEDIMETRIC LABEL - FREE IMMUNOSENSOR FOR RAPID DETECTION OF OCHRATOXIN A IN BEER AND WINE, refere-se a um imunossensor eletroquímico label-free para detecção de Ocratoxina A (OTA) em bebidas à base de cerveja e vinho. A modificação do eletrodo de Au modificado por cisteamina com moléculas de ferroceno levou a um aumento da condutividade do sistema, permitindo apreciar menores variações de impedância e assim atingir um limite inferior de detecção. O imunossensor desenvolvido apresenta uma ampla faixa linear e um limite de detecção muito baixo igual a 1 µg/kg, tornando o dispositivo adequado para detectar a quantidade de OTA em muitos produtos alimentícios comuns, como café, por exemplo. Além disso, trata-se de imunossensor com a utilização de ferroceno para melhoria na transferência de elétrons, sendo que a ativação é feita com glutaraldeído e bloqueio com etanolamina. A configuração do eletrodo e a modificação química da superfície é distinta da presente invenção.

[020] O documento em nome de RADI *et al.*, intitulado LABEL-FREE IMPEDIMETRIC IMMUNOSENSOR FOR SENSITIVE DETECTION OF OCHRATOXIN A, refere-se a um imunossensor eletroquímico sensível label-free para detecção sensível de OTA em diversos produtos, dentre eles, o café. Trata-se de eletrodo com modificação superficial com ácido aminobenzoico e carboxifenil, a etanolamina é usada como bloqueio. A

configuração do biossensor é diferente e não foram apresentados dados/resultados em amostras reais.

[021] De uma maneira geral, notam-se muitos esforços para o desenvolvimento de biossensores para detecção de ocratoxina A. Entretanto, as configurações apresentadas no estado da técnica são distintas e na maioria das vezes com materiais e moléculas diferentes. Nota-se também que na maioria dos trabalhos, parâmetros importantes como seletividade, reprodutibilidade não são apresentados e limitações em relação à faixa estreita de detecção podem impedir o escalonamento do sistema e, conseqüentemente, sua aplicabilidade. A configuração do biossensor proposto na presente invenção com superfície química de ouro modificado com cisteamina e ativação de grupos funcionais dos anticorpos com sistema EDC/NHS nas concentrações e condições descritas permite a detecção de OTA em amostras reais com elevada reprodutibilidade, seletividade e ampla faixa de detecção (0,5-100 ppb).

[022] Além disso, cabe ressaltar que um imunossensor impedimétrico de configuração simples, livre de rótulos, seletivo, com boa reprodutibilidade em amostras complexas e ainda com limites de detecção que cobrem as principais legislações internacionais para Ocratoxina A não foram relatados. O imunossensor proposto para o sensoriamento de Ocratoxina A oferece vantagens, tais como: simplicidade do biossensor, possibilidade de miniaturização, portabilidade, baixo custo e a não necessidade de pessoal treinado para a utilização do mesmo, sendo promissor para a quantificação do Ocratoxina A em matrizes complexas como alimentos, bebidas e amostras ambientais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[023] A presente invenção tem por objetivo propor um imunossensor eletroquímico de configuração simples, livre de rótulo para detecção de Ocratoxina A com elevada sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade que poderá ser aplicado em uma ampla gama de amostras, bem como um método para sua fabricação. Este sistema de detecção possui anticorpos orientados na superfície do eletrodo como elementos de reconhecimento e a impedância eletroquímica como sistema de detecção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[024] A Figura 1 ilustra as etapas de fabricação do imunossensor.

[025] A Figura 2 mostra gráficos de Nyquist do imunossensor relativos à limpeza química e física (A); Tratamento com plasma de oxigênio em diferentes tempos (B); concentrações (C) e tempo (D) para acoplamento covalente de anticorpos imobilizados. As inserções mostram as variações nos valores RCT. Os valores Delta RCT correspondem à diferença entre o RCT antes e depois da imobilização do anticorpo.

[026] A Figura 3 mostra o esquema do aparato para detecção de Ocratoxina utilizando o imunossensor.

[027] A Figura 4 é um gráfico do sinal de saída expresso como uma variação da resistência de transferência de carga (R_{CT}) em relação à concentração de ocratoxina A em uma amostra de café verde. Gráfico Nyquist para detecção de OTA em diferentes concentrações (A); Variações dos valores do R_{CT} em função das concentrações de OTA adicionadas ao imunossensor (inset); Curva padrão OTA em relação aos valores

R_{CT} (B). Os valores do Delta R_{CT} correspondem à diferença entre o R_{CT} antes e após a adição do analito.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[028] A presente invenção refere-se a um método para a fabricação de um imunossensor eletroquímico de elevada sensibilidade para detecção de Ocratoxina A em amostras ambientais e de alimentos baseado no uso de anticorpos como elementos de reconhecimento e na impedância eletroquímica como método transdutor. O imunossensor em questão apresenta boa reprodutibilidade e seletividade quando aplicado em amostras reais e limites de detecção dentro da faixa de interesse para as principais legislações internacionais.

[029] Os detalhes para a construção da imunossensor eletroquímico são apresentados na Figura 1. O eletrodo é composto por um substrato de vidro BK7 com um filme de cromo (15 nm), seguido pela deposição de um filme de ouro 105 nm. A célula eletroquímica compreende um eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra-eletrodo.

[030] O método para a fabricação do imunossensor eletroquímico, as seguintes etapas são realizadas:

- (a) Limpeza dos eletrodos;
- (b) Formação da monocamada na superfície do eletrodo;
- (c) Ativação dos anticorpos;
- (d) Imobilização dos anticorpos na superfície do eletrodo;
- (e) Bloqueio dos sítios inespecíficos;

[031] Primeiramente os eletrodos devem ser limpos para remoção de eventuais resíduos orgânicos. A limpeza é realizada com plasma de oxigênio (99%) por não menos do que 60 segundos. Alternativamente, os eletrodos podem ser limpos

com hidróxido de potássio 2M em etanol, seguido de acetona e água ultrapura em ultrassom por 15 minutos cada.

[032] A formação da monocamada na superfície do eletrodo é realizada pela cisteamina. Este ligante possui grupo tiol que interage covalentemente com o ouro formando ligação dativa covalente S-Au disponibilizando na outra extremidade da molécula grupos NH₂ livres para acoplamento covalente com os anticorpos de interesse. A cisteamina na concentração de 0,5M é adicionada (3µl) ao eletrodo de trabalho por 12 horas. Após lavagem delicada com água ultrapura, 3 µL de uma solução contendo os anticorpos (100ug.mL⁻¹) são imobilizados na superfície através de ligação covalente. Para isso, os anticorpos devem ser previamente ativados com 8mM EDC ((1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e 5mM NHS (N-Hidroxisuccinamida), em PBS pH 7,2 e 10 mM por 2 horas. O bloqueio dos sítios inespecíficos é realizado com solução de caseína a 1% tamponada em PBS pH 7,2 10 mM.

[033] Resumidamente, o EDC, agente de ligação cruzada de comprimento zero, é utilizado para ativação de grupos COOH através de uma das ligações duplas do reagente carbodiimida, formando o intermediário O-acilureia. Em princípio, esse intermediário pode reagir diretamente com uma amina primária da proteína, mas esta reação sofre algumas limitações, tais como a baixa velocidade da reação, a susceptibilidade à hidrólise (tornando instáveis e de curta duração em solução aquosa), além da produção de uma N-acilureia, que não é reativa. A fim de competir de forma eficiente com a última reação e para fornecer uma maior estabilidade, o grupo abandonador NHS é utilizado, sendo

capaz de reagir com a amina primária e auxiliar no acoplamento proteico na presença de EDC. A reação inclui a formação de um éster ativo do intermediário (o produto de condensação do grupo carboxílico) e NHS que pode ainda reagir com um grupo amina do ligante tiolado na superfície do eletrodo formando finalmente uma ligação amida.

[034] A utilização desta estratégia de imobilização promove o acoplamento covalente dos anticorpos na superfície do eletrodo de trabalho de forma orientada. Esta orientação de anticorpos imobilizados na superfície de detecção desempenha um papel crítico na reprodutibilidade e sensibilidade de imunoenaios, pois permite que os sítios de reconhecimento (Fab) dos anticorpos estejam disponíveis para interação com o analito (Ocratoxina A). Na presente invenção, foram combinadas e otimizadas duas estratégias para orientação de anticorpos, a saber: limpeza da superfície com tratamento com plasma de oxigênio e acoplamento covalente envolvendo a cisteamina como ligante e o sistema EDC/NHS como forma de conjugação.

[035] O tratamento de plasma é um método de modificação de superfície usado para funcionalizar os substratos existentes aumentando a hidrofiliabilidade, podendo reduzir a desnaturação de proteínas ligadas ou fornecer um ponto de partida para tratamento químico adicional e conjugação covalente de proteínas/anticorpos.

[036] Sobre a conjugação covalente, o EDC é um agente de ligação cruzada de comprimento zero que acopla radicais carboxílicos a aminas primárias. A adição de NHS alavanca a eficiência da ligação, de modo que as amostras contendo grupos ativados por estes reagentes pode aumentar

consideravelmente a taxa de reação. A utilização do sistema EDC/NHS resulta na formação de ésteres succinâmidas reativos na superfície, a qual pode combinar com grupos amins primárias dos anticorpos e formar uma ligação peptídica com a camada de cisteamina na superfície.

Testes de otimização

[037] Visando a eficiência da conjugação e orientação de anticorpos na superfície dos eletrodos, a limpeza no plasma de oxigênio, concentração dos anticorpos e tempo de incubação para imobilização dos anticorpos foram otimizadas. A Tabela 1 apresenta os parâmetros e suas variações testadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1. Parâmetros otimizados para a fabricação do imunossensor eletroquímico para detecção de OTA.

Parameter	Variations
Protocolo de limpeza do eletrodo	Limpeza Química / Plasma de Oxigênio
Tempo de Plasma (s)	30 / 60 / 90
Concentração de anticorpos (ug.mL ⁻¹)	10 / 25 / 50 / 100 / 200
Tempo de incubação dos anticorpos (h)	0,5 / 2 / 4 / 12

Limpeza dos eletrodos

[038] Para avaliar a influência do tempo de plasma na remoção de contaminantes, os eletrodos foram caracterizados por EIS após o procedimento de limpeza. Os gráficos de Nyquist mostram a relação entre os componentes de impedância real e imaginário para uma faixa de frequências e são comumente usados para avaliar o componente resistivo do sistema. O semicírculo em regiões de alta frequência descreve

o processo de transferência de elétrons. Em contraste, a região linear de baixa frequência contém informações sobre o transporte de massa de espécies redox na interface eletrólito-eletrodo. Os dados de impedância foram ajustados ao modelo de Randles para determinar os valores de RCT que foram significativamente reduzidos com tratamento de oxigênio de plasma em comparação com a limpeza química (Figura 2A).

[039] O plasma de oxigênio é um método prático, econômico e ambientalmente seguro para a limpeza de eletrodos. A energia UV do vácuo gerada efetivamente quebra a maioria das ligações orgânicas dos contaminantes da superfície (EVGENY *et al.*, 2007). Além disso, espécies de oxigênio criadas no plasma reagem com contaminantes orgânicos e são evacuadas da câmara durante o processamento. A superfície resultante é ultra limpa (DEEGAN *et al.*, 1997). Os tempos de tratamento com plasma foram avaliados (Figura 2B), e houve uma redução significativa nos valores de RCT de 30 para 60 s. Como o tempo de limpeza de 90 s não alterou os valores do RCT, um tempo de 60 s foi escolhido para os experimentos subsequentes.

Concentração de anticorpos

[040] A quantidade de anticorpos imobilizados e sua orientação possuem um papel crítico no desempenho do imunossensor. Portanto, a quantidade de anticorpos necessária para cobrir toda a superfície do eletrodo de trabalho foi determinada pelo método de acoplamento covalente com o sistema EDC/NHS. Para isso, os espectros de EIS foram coletados e os dados apresentados no diagrama de Nyquist (Figura 2C). A alteração nos valores do RCT pode

refletir a quantidade de anticorpos imobilizados. Além disso, o aumento da camada orgânica formada dificulta a difusão dos elétrons em direção à superfície do eletrodo e, conseqüentemente, aumenta os valores do RCT. Com base nos valores de RCT observados, pode-se notar que a saturação ocorre a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando que esta concentração foi suficiente para cobrir toda a área disponível do eletrodo de trabalho.

Tempo de incubação dos anticorpos

O tempo de incubação necessário para a imobilização do anticorpo nos eletrodos foi investigado usando EIS. Em termos gerais, para estratégias de imobilização covalente, quanto maior o tempo, maior a possibilidade de atingir o ponto de equilíbrio da reação de acoplamento. No entanto, longos tempos podem promover a evaporação do solvente, desidratação da amostra, distribuição não homogênea e agregação (HAYAT *et al.*, 2012), com impactos diretos na sensibilidade e reprodutibilidade de um biossensor. No entanto, como pode ser observado nos gráficos de Nyquist (Figura 2C), o tempo de duas horas foi suficiente para estabilizar as variações nos valores do RCT.

[041] O imunossensor eletroquímico fabricado compreende um elemento biosseletivo e um transdutor, em que o elemento biosseletivo é um anticorpo de coelho anti-Ocratoxina A imobilizado de forma orientada em monocamada automontada de tiol, e o transdutor é um dispositivo eletroquímico impedimétrico.

Detecção da Ocratoxina A

[042] Para realização da detecção da toxina, conforme mostrado na Figura 3, uma curva padrão prévia deverá ser

realizada com diferentes concentrações de uma solução controle de Ocratoxina A. O volume amostral é de apenas 3 μ L e o tempo de incubação no eletrodo de trabalho não deverá ser menor do que 10 minutos e superior a 30 minutos. Após este tempo, o eletrodo deverá ser lavado suavemente com PBS pH 7,2 10mM, seguido de água ultrapura antes de ser levado para medidas eletroquímicas.

[043] As medições eletroquímicas são realizadas usando KCl 0,1M como eletrólito de suporte e ferricianeto/ferrocianeto de potássio como sonda redox. As análises EIS são realizadas em um potenciostato com faixa de frequência de 10 kHz a 0,1Hz para determinação da resistência à transferência de carga (R_{CT}) e a construção da curva padrão analítica.

[044] A detecção da ocratoxina em amostras reais envolve a utilização de um tampão de extração, haja vista se tratar de um analito hidrofóbico. A solução de extração é composta por metanol 20% em PBS pH 7,2 10mM. O volume utilizado deverá ser entre cinco e dez vezes o volume/peso da amostra e a homogenização deverá ser realizada por 5 minutos em agitação mecânica. O fator de diluição deverá ser levado em conta na hora da quantificação do analito alvo.

[045] Após a determinação da curva padrão, os ensaios de detecção são realizados com apenas 3 microlitros da amostra extraída. As medidas eletroquímicas deverão ser realizadas com eletrólito de suporte e sonda redox, assim como descrito anteriormente.

[046] As concentrações de 0,1 a 200 ng.mL⁻¹ de OTA foram avaliadas por EIS, e os valores de R_{CT} foram determinados (Figura 4). Observa-se um incremento

proporcional dos valores do RCT à medida que a concentração de OTA aumentava. A ligação da OTA aos anticorpos pode fornecer uma carga negativa adicional devido à presença de ácidos carboxílicos ionizáveis e hidroxilas na estrutura química da micotoxina. Tem sido discutido que alterações conformacionais das moléculas de anticorpo após a formação do complexo com o antígeno podem dificultar a transferência de elétrons e, conseqüentemente, aumentar os valores de RCT (AKAFZADE *et al.*, 2019). Uma relação linear foi observada entre 0,5 e 100 ng.mL⁻¹ de concentrações de OTA, enquanto a saturação ocorreu em 200 ng.mL⁻¹, provavelmente devido a impedimento estérico ou saturação de moléculas de OTA acopladas (JODRA *et al.*, 2015). O limite de detecção calculado foi de 0,15 ng.mL⁻¹.

[047] Por se tratar de um método rápido, sensível e de baixo custo, esta detecção poderá ser disponibilizada para utilização em toda a cadeia produtiva de alimentos e em amostras ambientais, ampliando o monitoramento confiável com atendimento a legislação nacional e internacional e agregação de valor a diversas *commodities*. É válido lembrar que poderá também ser aplicado em uma ampla gama de moléculas-alvo, dada a sua versatilidade, mudando apenas do ligante de reconhecimento (anticorpos).

[048] A detecção de ocratoxina A com base na técnica de impedância eletroquímica com uso de anticorpos como elemento de reconhecimento seletivo diferencia-se dos demais sistemas de detecção de Ocratoxina A, com potencial de aplicabilidade a curto prazo, pelo menos pelas seguintes razões: 1) Confiabilidade - A detecção possui elevada sensibilidade e especificidade acima dos testes rápidos

imunocromatográficos atualmente comercializados para micotoxinas; 2) Versatilidade - pode ser aplicado para detecção de outros analitos/moléculas-alvo, mudando-se apenas o ligante de reconhecimento no substrato desenvolvido. Além disso, o sistema de detecção poderá ser aplicado para análises multiplex, ou seja, ser capaz de detectar dois ou mais contaminantes ao mesmo tempo com o uso de células eletroquímicas com mais de um eletrodo de trabalho; 3) Baixo Custo - Se comparado com as técnicas cromatográficas tradicionais, a construção dos dispositivos envolve materiais e reagentes de baixo custo; 4) Fácil Operação - A detecção possui baixa complexidade operacional e passível de se tornar portátil a fim de permitir a identificação no ponto de amostragem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[049] AALUND, O., Branfeldt K., Hald B., Krogh P., Poulsen K. A radioimmunoassay for ochratoxin A: A preliminary investigation. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section C Immunol. 1975;83C:390-392.

[050] ADÁNYI, N.; Levkovets, I.A.; Rodriguez-Gil, S.; Ronald, A.; Váradi, M.; Szendrő, I. Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. Biosens. Bioelectron. 2007, 22, 797-802.

[051] AKAFZADE, H, Sharma, SC, Hozhabri, N, Chen, W, Ma, L. Raman spectroscopy analysis of new copper-cysteamine photosensitizer. J Raman Spectrosc. 2019; 50: 522- 527. <https://doi.org/10.1002/jrs.5541Raman>.

[052] ALARCON, S.; Palleschi, G.; Compagnone, D.; Pascale, M.; Visconti, A.; Barnavetro, I. Monoclonal

antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat. *Talanta* 2006, 69, 1031-1037.

[053] ASSAF H., Azouri H., Pallardy M. Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of BCL-x1. *Toxicol. Sci.* 2004;79:335-344. doi: 10.1093/toxsci/kfh123.

[054] BADEA, M.; Floroian, L.; Restani, P.; Cobzac, S.C.A.; Moga, M. Ochratoxin A Detection on Antibody-Immobilized on BSA-Functionalized Gold Electrodes. *PLoS ONE* 2016, 11, e0160021.

[055] BOORMAN G.A., Hong H.L., Dieter M.P., Hayes H.T., Pohland A.E., Stack M., Luster M.I. Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984;72:304-312. doi: 10.1016/0041-008X(84)90315-6.

[056] CREPPY E.E., Størmer F.C., Kern D., Röschenthaler R., Dirheimer G. Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.* 1983;47:239-247. doi: 10.1016/0009-2797(83)90160-6.

[057] EVGENY V. Shun'ko & Veniamin V. Belkin (2007). Cleaning properties of atomic oxygen excited to metastable state $2s22p4(S10)$. *J. Appl. Phys.* 102 (8): 083304-1-14. Bibcode : 2007JAP ... 102h3304S . doi: 10.1063 / 1.2794857.

[058] HAYAT A., Barthelmebs L., Marty J-L. Electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of okadaic acid in mussel sample. *Sensors and Actuators B: Chemical.* Volumes 171-172. 2012, Pages 810-815.

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.075>.

[059] IARC (International Agency for Research on Cancer) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 56. IARC; Lyon, France: 1993. p. 489.

[060] JODRA A., Hervas M., Lopez M.A., Escarpa A. Disposable electrochemical magneto immunosensor for simultaneous simplified calibration and determination of Ochratoxin a in coffee samples. *Sens. Actuators B Chem.* 2015;221:777-783. doi: 10.1016/j.snb.2015.07.007.

[061] KARCZMARCZYK, A.; Baeumner, A.J.; Feller, K.-H. Rapid and sensitive inhibition-based assay for the electrochemical detection of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in red wine and milk. *Electrochim. Acta* 2017, 243, 82-89.

[062] KREISSIG T., Hoffmann R., Zuchner T. Homogeneous fluorescence-based immunoassay detects antigens within 90 seconds. *Anal. Chem.* 2011;83:4281-4287.

[063] LEA T., Steien K., Størmer F. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia.* 1989;107:153-159. doi: 10.1007/BF00707553.

[064] LIU X.P., Deng Y.J., Jin X.Y., Chen L.G., Jiang J.H., Shen G.L., Yu R.Q. Ultrasensitive electrochemical immunosensors for ochratoxin A using gold colloid-mediated hapten immobilization. *Anal. Biochem.* 2009;389:63-68.

[065] MALIR F., Ostry V., Pfohl-Leszkowicz A., Novotna E. Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity—An overview. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* 2013;98:493-502. doi: 10.1002/bdrb.21091.

[066] MUCHINDU, M.; Iwuoha, E.; Pool, E.; West, N.; Jahed, N.; Baker, P.; Waryo, T.; Williams, A. Electrochemical Ochratoxin A Immunosensor System Developed on Sulfonated

Polyaniline. *Electroanalysis* 2011, 23, 122-128.

[067] MÜLLER G., Burkert B., Rosner H., Köhler H. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on human kidney cell lines. *Toxicol. In Vitro*. 2003;17:441-448. doi: 10.1016/S0887-2333(03)00053-5.

[068] MYNDRUL, V.; Viter, R.; Savchuk, M.; Shpyrka, N.; Erts, D.; Jevdokimovs, D.; Silamiķelis, V.; Smyntyna, V.; Ramanavicius, A.; Iatsunskyi, I. Porous silicon based photoluminescence immunosensor for rapid and highly-sensitive detection of Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron*. 2018, 102, 661-667.

[069] ROBERT D. Deegan, Olgica Bakajin, Todd F. Dupont, Greg Huber, Sidney R. Nagel, Thomas A. Witten. *Nature*, 1997, 389, pp.827-829. DOI: 10.1038/39827.

[070] STUDER-ROHR I., Schlatter J., Dietrich D.R. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch. Toxicol*. 2000;74:499-510. doi: 10.1007/s002040000157.

[071] VITER, R.; Savchuk, M.; Iatsunskyi, I.; Pietralik, Z.; Starodub, N.; Shpyrka, N.; Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A. Analytical, thermodynamical and kinetic characteristics of photoluminescence immunosensor for the determination of Ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron*. 2018, 99, 237-243.

[072] WANG, Y., Ning, G., Wu, Y., Wu, S., Zeng, B., Liu, G., et al. (2019b). Facile combination of beta-cyclodextrin host-guest recognition with exonuclease-assistant signal amplification for sensitive electrochemical assay of ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron*. 124-125, 82-88. doi: 10.1016/j.bios.2018.10.007.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a fabricação de um imunossensor eletroquímico, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- (a) Limpeza dos eletrodos;
- (b) Formação da monocamada na superfície do eletrodo;
- (c) Ativação dos anticorpos;
- (d) Imobilização dos anticorpos na superfície do eletrodo de trabalho de forma orientada; e
- (e) Bloqueio dos sítios inespecíficos.

em que a orientação dos anticorpos é realizada pela combinação e otimização da limpeza da superfície com tratamento com plasma de oxigênio e acoplamento covalente envolvendo a cisteamina como ligante e o sistema EDC/NHS como forma de conjugação.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que alternativamente a limpeza dos eletrodos é realizada com hidróxido de potássio 2M em etanol, seguido de acetona e água ultrapura em ultrassom por 15 minutos cada.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a formação da monocamada é realizada pela adição de cisteamina na concentração de 0,5M na superfície do eletrodo de trabalho por 12 horas, seguido de lavagem delicada com água ultrapura.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os anticorpos são ativados com 8mM EDC ((1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e 5mM NHS (N-Hidroxisuccinamida), em PBS pH 7,2 e 10 mM por 2 horas.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de que a imobilização dos anticorpos na superfície do eletrodo de trabalho é realizada através de ligação covalente pelo sistema EDC/NHS.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o bloqueio dos sítios inespecíficos é realizado com solução de caseína a 1% tamponada em PBS pH 7,2 10 mM.

7. Imunossensor eletroquímico fabricado pelo método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que compreende um elemento biosseletivo e um transdutor, em que o elemento biosseletivo é um anticorpo de coelho anti-Ocratoxina A imobilizado de forma orientada em monocamada automontada de tiol, e o transdutor é um dispositivo eletroquímico impedimétrico.

8. Uso do imunossensor eletroquímico conforme definido na reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de ser para a detecção da Ocratoxina A.

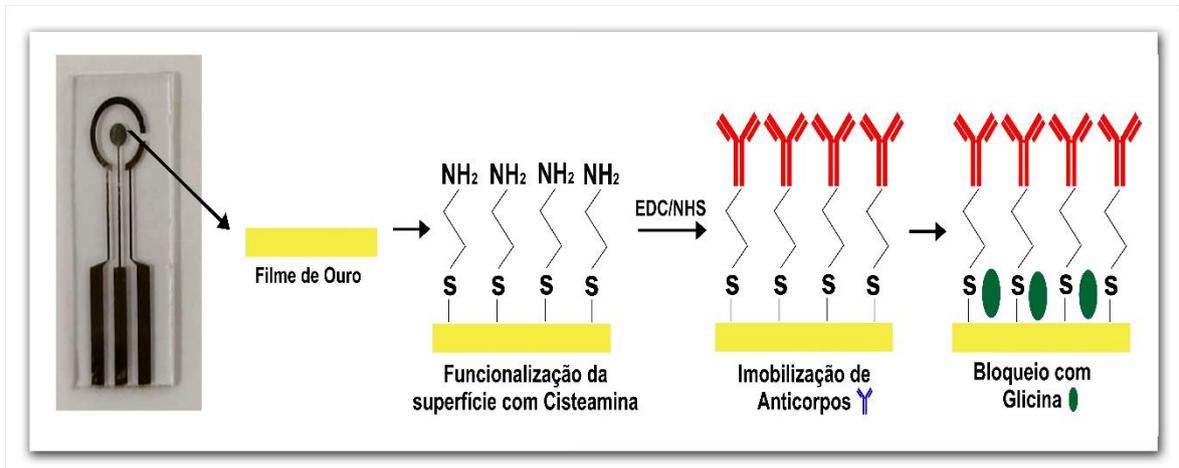


Figura 1

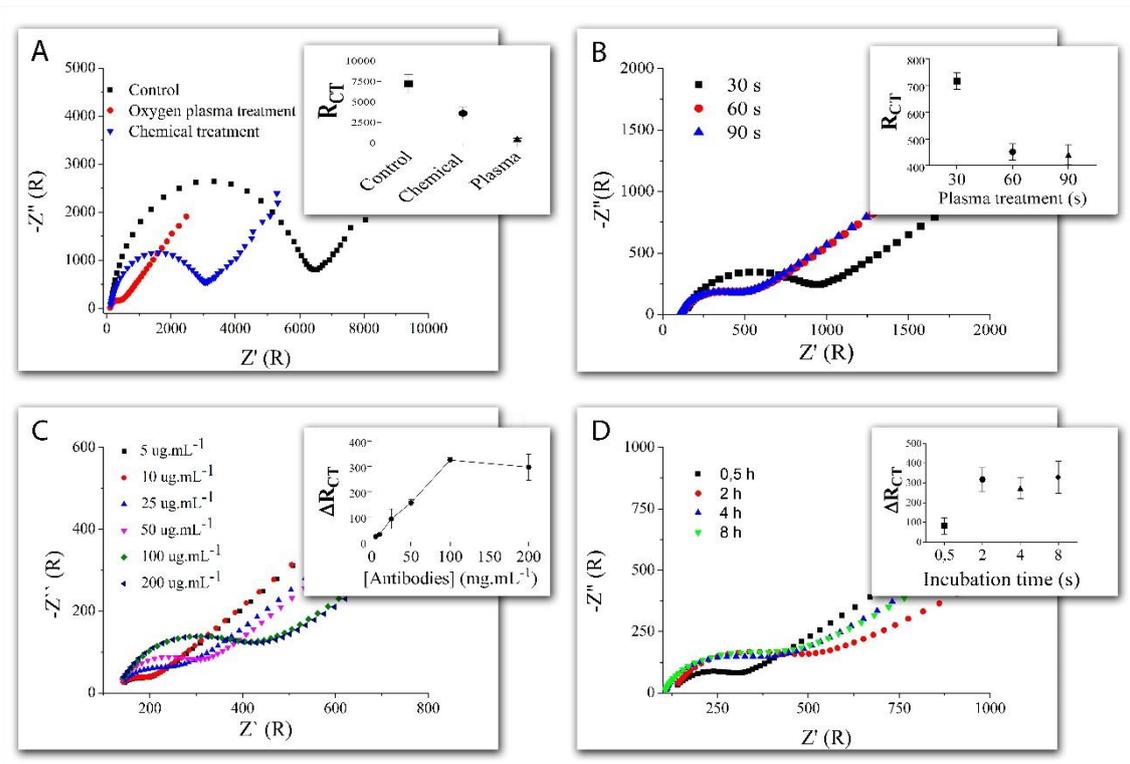


Figura 2

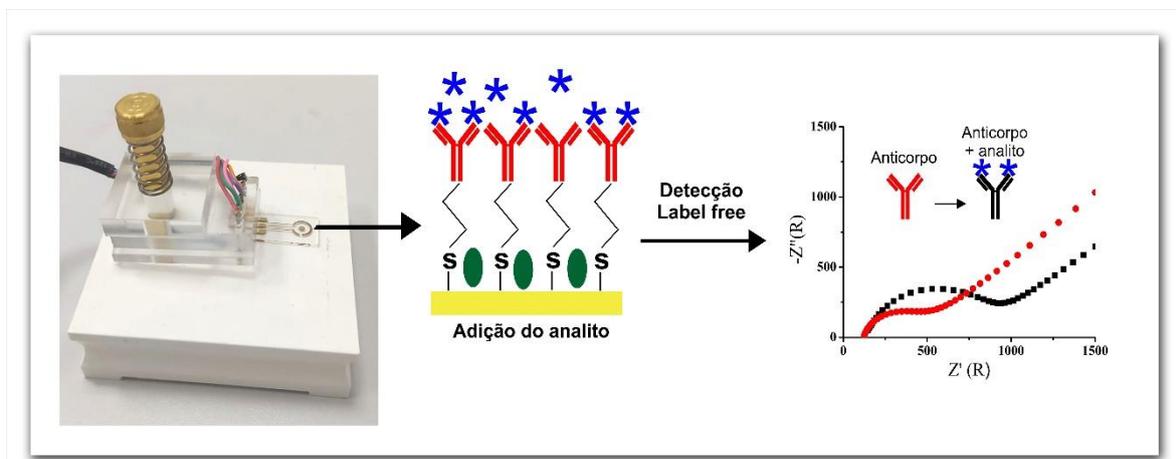


Figura 3

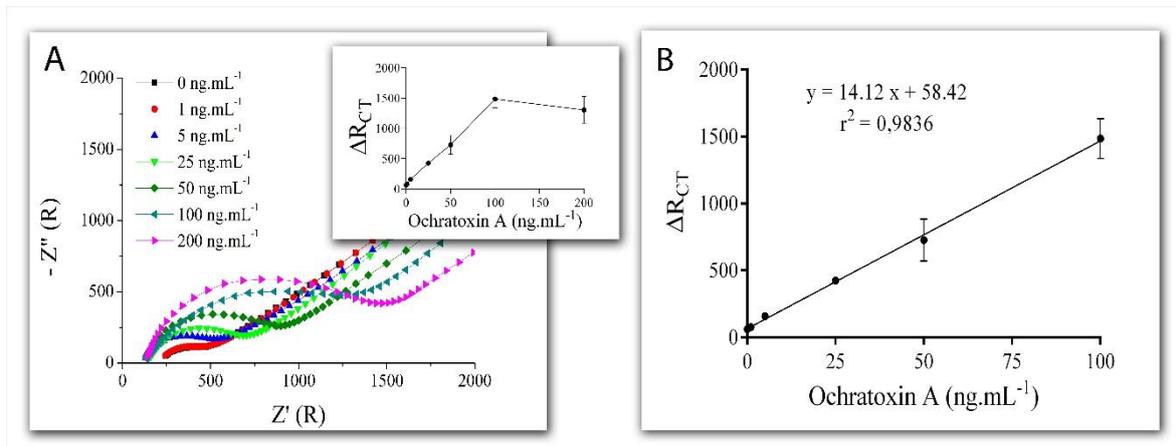


Figura 4

RESUMO**MÉTODO PARA A FABRICAÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO,
IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO E SEU USO**

A presente invenção refere-se a um imunossensor eletroquímico de configuração simples e livre de rótulo para detecção de Ocratoxina A. Adicionalmente, a presente invenção refere-se ao método para sua fabricação, onde um eletrodo de vidro recoberto de ouro (BK7/Au) cuja superfície foi modificada com monocamadas auto-organizadas com ligante tiol e grupos NH₂ livres é utilizado. Sobre estas superfícies, anticorpos de coelho anti-OTA foram imobilizados de forma orientada por acoplamento covalente utilizando sistema EDC-NHS. A detecção é realizada pela alteração na resistência de transferência de carga na região de superfície ativa do eletrodo causado pela ligação do analito com o anticorpo. O imunossensor proposto propiciará um monitoramento confiável dos níveis dos ocratoxina A em uma ampla gama de amostras ambientais, podendo ser uma ferramenta para atendimento a legislação nacional e internacional devido a sensibilidade, construção simples, viabilidade de miniaturização e baixo custo.