



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
NANOPLAQUETAS DE GRAFITE PARA DETECÇÃO DE
MICROCISTINA-LR**

Aluna: Nicole Zanato

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC

2019

NICOLE ZANATO

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
NANOPLAQUETAS DE GRAFITE PARA DETECÇÃO DE
MICROCISTINA-LR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zanato, Nicole

Desenvolvimento de um Imunossensor Contendo
Nanopartículas de Prata e Nanoplaquetas de Grafite
para Detecção de Microcistina-LR / Nicole Zanato ;
orientadora, Iolanda Cruz Vieira, 2019.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

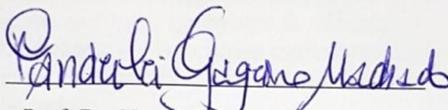
1. Química. 2. Imunossensor label-free. 3.
Nanoplaquetas esfoliadas de grafite. 4.
Nanopartículas . 5. Microcistina-LR. I. Vieira,
Iolanda Cruz. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

NICOLE ZANATO

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR
CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
NANOPLAQUETAS DE GRAFITE PARA DETECÇÃO DE
MICROCISTINA-LR**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

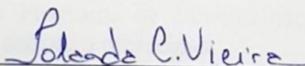
Florianópolis, 01 de março de 2019.



Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado

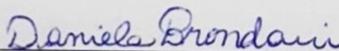
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

BANCA EXAMINADORA:

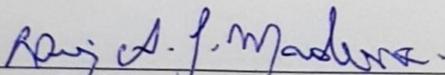


Prof.^a. Dr.^a. Iolanda Cruz Vieira
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Prof.^a. Dr.^a. Daniela Brondani
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Gicela e Cesar que seguiram me apoiando durante minha jornada de todas as maneiras possíveis;

Aos meus irmãos e parceiros Giulia e César Augusto;

Ao meu namorado e por muito tempo parceiro de pesquisa Lucas que sempre esteve ao meu lado;

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Iolanda por não medir esforços em nos ajudar;

Aos colegas do LaBios, atuais: Aline, Amanda, Felipe e Rávila e também aos antigos por deixarem de ser colegas e tornarem-se amigos;

A todos os outros amigos, da química, da dança e de toda vida por estarem presentes tanto nos momentos de dificuldade quanto nos momentos de celebração, vocês foram muito importantes!

A todos os meus professores, pois cada um foi responsável pela pessoa que me tornei;

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC), pelas análises de microscopia;

Ao Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio) pelas medidas de potencial zeta;

Aos professores: Dr^a. Daniela Brondani e Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira por aceitarem participar da banca examinadora; À UFSC e ao Programa de Pós-graduação em química pela oportunidade e estrutura oferecidas;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Este trabalho relata o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico *label-free* construído em uma etapa para a detecção de microcistina-LR (MCLR) aplicando voltametria de onda quadrada (VOQ). A modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo foi realizada através da construção de uma plataforma imobilizadora para anticorpos constituída de nanoplaquetas esfoliadas de grafite e nanopartículas de prata, que atuam também como sonda redox. Foram realizados estudos de caracterização do nanomaterial utilizando espectroscopia UV-Vis, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta, espectroscopia de impedância eletroquímica e VOQ. A MCLR é uma cianotoxina produzida por cianobactérias encontradas em diferentes ambientes aquáticos e é considerada altamente prejudicial para seres humanos e animais se ingerida em baixas concentrações, além de ter sido responsável por diversas mortes no desastre da Síndrome de Caruaru em 1996. Este imunossensor em condições otimizadas, utilizando eletrólito suporte PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 9,0 e tempo de incubação de apenas 10 minutos foi capaz de obter uma curva de calibração de 0,5 a 5000 ng mL⁻¹ de MCLR com limite de detecção de 0,017 ng mL⁻¹. O estudo para avaliar compostos presentes em água do mar como KCl, KBr, NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ e CaCl₂ que poderiam interferir na análise não demonstrou interferências. A determinação de MCLR realizada em amostra obtida na praia de Jurerê, em Florianópolis – Santa Catarina fortificada com 1,0 ng mL⁻¹ de MCLR demonstrou bom resultado apresentando erro relativo de 5,8 % e desvio padrão relativo (RSD) de 4,4 %. O estudo de estabilidade realizado apresentou 94,3 % do resultado inicial após sete dias. O estudo de repetibilidade intra-dia apresentou RSD de 14,1 % e a repetibilidade inter-dia 7,0 %. Os resultados obtidos indicam que o imunossensor apresenta performance rápida, sensível, seletiva e de alta estabilidade na detecção de MCLR em água do mar demonstrando-se uma ferramenta útil nesta análise com possibilidade de aplicação em outras amostras devido a sua faixa de trabalho.

Palavras-chave: Imunossensor. *Label-free*. Nanopartículas. Nanoplaquetas esfoliadas de grafite. Microcistina-LR.

ABSTRACT

This work reports the development of a label-free electrochemical immunosensor assembled in one-step for the detection of microcystin-LR (MCLR) in seawater applying square-wave voltammetry (SWV). The surface of a glassy carbon electrode was modified by building an immobilization platform for antibodies using exfoliated graphite nanoplatelets and silver nanoparticles, also applied as redox probe. Nanomaterial characterization studies were performed using UV-Vis spectroscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, zeta potential, electrochemical impedance spectroscopy and SWV. MCLR is a cyanotoxin produced by cyanobacteria that can be found in different aquatic environments and is considered highly harmful to humans and animals if ingested at low concentrations, in addition to being responsible for several deaths in the Caruaru Syndrome's disaster in 1996. This immunosensor in optimized conditions, using 0.01 mol L⁻¹ pH 9.0 PBS supporting electrolyte and incubation time of only 10 minutes was able to obtain a calibration curve from 0.5 to 5000 ng mL⁻¹ MCLR with a detection limit of 0.017 ng mL⁻¹. The study to evaluate compounds present in seawater such as KCl, KBr, NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ and CaCl₂, that could interfere in the analysis did not present interference. MCLR determination was carried out in a sample collected at Jurerê Beach in Florianópolis – Santa Catarina spiked with 1.0 ng mL⁻¹ MCLR and showed good results presenting relative error of 5.8 % and relative standard deviation (RSD) of 4.4 %. The stability study presents 94.3 % of the initial response after seven days. Intra-day precision study presented RSD of 14.1 % and inter-day precision study presented 7.0 %. The results obtained indicate that the immunosensor presents fast, sensitive, selective and highly stable performance for the detection of MCLR in seawater presenting itself as a useful tool in this analysis with a possibility of application in other sorts of samples due to its work range.

Keywords: Immunosensor. Label-free. Nanoparticles. Exfoliated graphite nanoplatelets. Microcystin-LR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da formação do imunocomplexo.....	22
Figura 2. Representação do funcionamento de um imunoenensaio do tipo competitivo.....	24
Figura 3. Representação do funcionamento de um imunoenensaio do tipo sanduíche.....	24
Figura 4. Representação do funcionamento de um imunossensor voltamétrico sem marcação onde (1) é o pico base e (2) é a resposta de corrente na presença do antígeno.....	25
Figura 5. Representação de nanopartículas (círculos) estabilizadas através da adsorção de polímeros (estruturas verdes) e cargas em sua superfície através de (A) efeito estérico, (B) efeito eletrostático e (C) efeito eletroestérico.....	31
Figura 6. Estrutura geral das microcistinas onde as posições X e Y pertencem aos aminoácidos variáveis e R1 e R2 podem ser grupos metil ou hidrogênio.....	33
Figura 7. Estrutura da MCLR com destaque para os L-aminoácidos que a identificam: leucina (L) em verde e arginina (R) em vermelho.....	34
Figura 8. Representação da preparação da dispersão de AgNP-Nafion e xGnP.....	41
Figura 9. Representação da construção do imunossensor.....	42
Figura 10. Equação de oxidação da prata e proposta de funcionamento do imunossensor representando na primeira etapa obtenção do pico base (1) e na segunda etapa obtenção da resposta de corrente na presença do antígeno (2).....	46
Figura 11. Voltamogramas de VOQ para (a) GCE limpo, (b) AgNP-Nafion/GCE, (c) AgNP-Nafion-xGnP/GCE e (d) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE (e) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/MC-LR/GCE em PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 9,0).....	47
Figura 12. Diagramas de Nyquist obtidos para (a) GCE limpo, (b) AgNP-Nafion/GCE, (c) AgNP-Nafion-xGnP/GCE e (d) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo 5 mmol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} , circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequências de 0,1–100000 Hz. Inserido: aproximação dos diagramas (c), (a) e (d).....	48
Figura 13. Voltamogramas obtidos para (a) GCE, (b) GCE modificado com AgNP-Nafion (45 °C), (c) AgNP-Nafion (25 °C), (d) AgNP-BSA (25 °C), (e) AgNP-BSA (45 °C) em PBS (0,01 mol	

L ⁻¹ , pH 7,4). Inserido: resposta relativa de corrente para cada eletrodo modificado.....	49
Figura 14. Voltamogramas obtidos para o eletrodo modificado com AgNP-Nafion utilizando VOQ (parâmetros: frequência 50 Hz, incremento 5 mV e amplitude 50 mV) e VPD (parâmetros: intervalo de tempo 50 ms, incremento 5 mV e amplitude 25 mV) em solução de PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 7,4).....	51
Figura 15. Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo modificado com AgNP-Nafion em solução de PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 7,4).....	52
Figura 16. Resposta relativa obtida para as medidas de corrente realizadas em solução de PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 7,4) utilizando o filme formado pela mistura de diferentes volumes de dispersão de AgNP e 1 mg de xGnPs.....	53
Figura 17. Estudo da proporção de anti-MCLR:AgNP-Nafion-xGnP a partir da supressão do pico base obtido em solução de PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 7,4) para o imunossensor construído com as diferentes dispersões.....	54
Figura 18. Espectro UV-Vis para as AgNP-Nafion.....	55
Figura 19. Imagens obtidas através de TEM para (A) AgNP-Nafion e (B) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR e histogramas com a distribuição de números de partículas por diâmetros para (C) AgNP-Nafion e (D) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR.....	56
Figura 20. Micrografias de SEM-FEG para (A) GCE limpo, (B) AgNP-Nafion/GCE, (C) AgNP-Nafion-xGnP/GCE e (D) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE obtidas utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kV e ampliação de 5.000x.....	57
Figura 21. Disposições possíveis dos anticorpos imobilizados em (A) AgNP-Nafion e (B) xGnP.....	59
Figura 22. Otimização dos parâmetros da VOQ: (A) frequência (faixa de estudo: 20 –80 Hz) com incremento de 5 mV e amplitude de 50 mV; (B) incremento (faixa de estudo: 1 –10 mV) com frequência de 20 Hz e amplitude de 50 mV; (C) amplitude (faixa de estudo: 10 –100 mV) com frequência de 20 Hz e incremento de 3 mV.....	60
Figura 23. Respostas de corrente obtidas para o imunossensor proposto em solução de PBS (0,01 mol L ⁻¹) em pH 7, 8 e 9.....	61
Figura 24. Resposta relativa das supressões de corrente obtidas após incubação com 2 µL de solução de MCLR na concentração 1,0 ng mL ⁻¹ sobre o imunossensor proposto por diferentes tempos.....	63

Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada em PBS (0,01 mol L ⁻¹ , pH 9.0) onde ‘a’ representa o pico base (0,0 ng mL ⁻¹ MCLR) e ‘b a f’ representam as concentrações 0,50; 5,0; 50,0; 500 e 5000 ng mL ⁻¹	64
Figura 26. Curva de calibração para MCLR.....	64
Figura 27. Resposta relativa do imunossensor proposto na presença dos possíveis interferentes.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do imunossensor desenvolvido com imunossensores descritos na literatura.....	66
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADDA – Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4(E),6(E)-decadienoico
- Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata/cloreto de prata
- AgNP – Nanopartículas de prata
- anti-MCLR – Anticorpo para MCLR
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- A – Alanina
- BSA – Albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*)
- CNT – Nanotubos de carbono
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- E – Potencial elétrico
- EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)
- ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immuno sorbent assay*)
- FEG – Canhão de emissão de campo (*Field emission gun*)
- GCE – Eletrodo de carbono vítreo (*Glassy carbono electrode*)
- Hep – Heparina
- HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (*High performance liquid chromatography*)
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental
- LCME – Laboratório central de microscopia eletrônica
- LOD – limite de detecção (*Limit of detection*)
- LOQ – limite de quantificação (*Limit of quantification*)
- L – Leucina
- MC – Microcistina
- MCLR – Microcistina-LR
- MDHA – metildehidroalanina
- MS – Espectrometria de massas (*Mass spectrometry*)
- OMS – Organização mundial da saúde
- PAH – Hidrocloro de polialilamina (*Poly(allylamine) hydrochloride*)
- PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate buffer saline*)
- PDA – Arranjo de fotodiodos (*Photodiode array*)
- PEI – Polietilenoimina
- PPI – Proteína serina/treonina fosfatase 1 (*serine/threonine protein phosphatase 1*)

PP2A – Proteína serina/treonina fosfatase 2A (*serine/threonine protein phosphatase 2A*)

R – Arginina

RSD – Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

VOQ – Voltametria de onda quadrada

VPD – Voltametria de pulso diferencial

vs – versus

xGnP – Nanoplaquetas esfoliadas de grafite

Y – Tirosina

Δi – Corrente de pico resultante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	Sensores	21
2.2	Imunossensores	26
2.2.1	Imunossensores com marcação e sem marcação.....	26
2.3	Técnicas eletroanalíticas	22
2.3.1	Voltametria	23
2.3.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	27
2.4	Nanomateriais	28
2.4.1	Nanoplaquetas esfoliadas de grafite	28
2.4.2	Nanopartículas metálicas	29
2.5	Cianotoxinas	31
2.5.1	Microcistina-LR.....	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Reagentes e materiais.....	39
4.2	Instrumentação.....	40
4.3	Metodologia.....	41
4.3.1	Síntese das nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion, BSA e heparina	41
4.3.2	Preparo da dispersão de nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion e nanoplaquetas esfoliadas de grafite.....	41

4.3.3	Construção do imunossensor.....	42
4.3.4	Medidas eletroquímicas	42
4.3.5	Obtenção da amostra e quantificação de MCLR....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Princípio de funcionamento do imunossensor.....	48
5.2	Comportamento eletroquímico	50
5.3	Otimização da síntese das nanopartículas	52
5.4	Escolha da técnica voltamétrica	50
5.5	Otimização da quantidade de xGnP e AgNP-Nafion...55	
5.6	Otimização da quantidade de anti-MCLR	593
5.7	Caracterização dos nanomateriais.....	60
5.7.1	Espectroscopia UV-Vis.....	55
5.7.2	Microscopias TEM e FEG-SEM.....	58
5.7.3	Medidas de potencial zeta	55
5.8	Otimização dos parâmetros da VOQ.....	62
5.9	Estudo do pH do eletrólito suporte.....	60
5.10	Estudo do tempo de incubação.....	62
5.11	Curva de calibração.....	63
5.12	Estudo de possíveis interferentes.....	66
5.13	Estudo da estabilidade e repetibilidade inter-dia e intra-dia	68
5.14	Determinação em amostra	68
6	CONCLUSÃO.....	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Para que a população mundial tenha uma boa qualidade de vida é extremamente importante o monitoramento da qualidade da água disponível para uso. Com esta preocupação, vem crescendo o número de estudos aplicados à descoberta de efeitos colaterais causados por desequilíbrios no meio ambiente por causas principalmente antropogênicas, além de formas de detectar e controlar a presença de substâncias que podem ser nocivas na água.

Um tipo de desequilíbrio ambiental muito comum é a eutrofização de ecossistemas aquáticos causada pelo excesso de nutrientes presentes em corpos aquáticos, geralmente por descarte inapropriado de rejeitos produzidos por humanos. O excesso de nutrientes pode promover a reprodução descontrolada de alguns organismos desencadeando uma série de fatores que pode dizimar um ecossistema. Um dos organismos que apresenta facilidade de crescimento em ambientes repletos de nutrientes são as cianobactérias, microorganismos que produzem cianotoxinas altamente nocivas para humanos e animais, mesmo em baixas concentrações. Estas cianotoxinas podem ser acumuladas em organismos aquáticos como moluscos, camarões e peixes sendo posteriormente ingeridos por humanos e conseqüentemente gerando intoxicações graves, de maneira que sua detecção e controle são extremamente necessários.

A importância do controle de cianotoxinas no Brasil cresceu após um incidente ocorrido na década de 90 onde diversas pessoas foram a óbito após exposição intravenosa a água contaminada, mais especificamente com a classe das microcistinas. Desde então buscam-se formas de detectá-las de maneira sensível, seletiva, rápida e com baixo custo, de forma que facilite o acesso a análise de águas com suspeita de contaminação. Visando estes requisitos o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos se apresenta como um método promissor e eficiente na detecção de microcistina-LR.

Este imunossensor foi desenvolvido a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo em uma etapa, utilizando nanomateriais e anticorpos, para a detecção de antígenos microcistina-LR em água do mar, visando avaliar a segurança dos seres humanos em relação a exposição a esta toxina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sensores

Sensores químicos são dispositivos capazes de registrar alterações que acontecem no meio no qual estão inseridos com manipulação mínima do sistema e gerando um sinal que pode ser relacionado diretamente com a concentração de uma espécie em uma amostra (THÉVENOT *et al.*, 2001; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Os sensores eletroquímicos são constituídos por um transdutor físico-químico modificado por um elemento de reconhecimento químico (receptor) formando uma camada seletiva (THÉVENOT *et al.*, 2001). O transdutor é um eletrodo, que recebe o nome de indicador, acoplado a um sistema de transdução de sinal responsável por transformar o estímulo recebido pelo receptor em um sinal eletrônico mensurável. No caso dos sensores eletroquímicos voltamétricos é registrada uma resposta de corrente resultante da oxidação ou redução de uma espécie eletroativa devido à aplicação de um potencial. A obtenção de informações analíticas sobre um determinado analito depende da capacidade desta camada em reconhecer seletivamente este analito dentre os componentes da amostra (ROGERS, 2000; THÉVENOT *et al.*, 2001; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

As modificações realizadas em um eletrodo têm como objetivo principal pré-estabelecer e controlar a interface eletrodo-solução para alterar propriedades do eletrodo base como seletividade, sensibilidade, estabilidade e reatividade. Estas modificações são comumente realizadas através da adição de monocamadas auto-organizadas, nanomateriais, materiais compósitos, filmes poliméricos e/ou componente biológico sobre o material constituinte do eletrodo original (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002).

O sensor cuja superfície foi modificada com elementos biológicos tais como enzimas, DNA, anticorpos, material biomimético ou microorganismos recebe o nome de biossensor. Estes elementos biológicos (biorreceptores) são responsáveis pelo reconhecimento de um analito ou uma classe de analitos tornando o sensor mais seletivo e mais sensível (ROGERS, 2000; LUPPA;

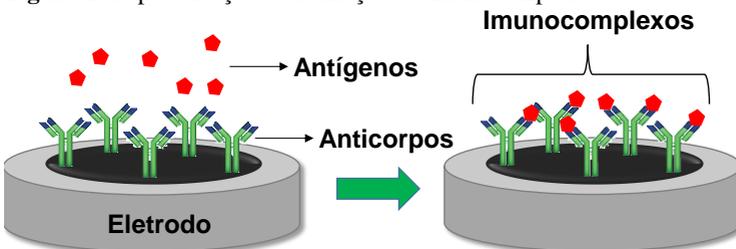
SOKOLL; CHAN, 2001). Algumas vantagens observadas na aplicação de biossensores em relação a outras técnicas analíticas tais como cromatografia, espectrofotometria e eletroforese são a rapidez, uso de baixa quantidade de amostra, possibilidade de miniaturização, monitoramento *in situ* e alta seletividade, que podem ser aliados às técnicas eletroanalíticas (LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001; MELLO; KUBOTA, 2002; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006; FELIX; ANGNES, 2018). Dentre os biossensores, destacam-se aqueles baseados na interação de bioafinidade antígeno-anticorpo, os quais são denominados imunossensores (ROGERS, 2000; LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001; MELLO; KUBOTA, 2002; FELIX; ANGNES, 2018).

2.2 Imunossensores

Os imunossensores são dispositivos que se baseiam na interação de extrema afinidade entre um antígeno e seu anticorpo correspondente (imunorreação), combinando a especificidade elevada desta reação com a sensibilidade e conveniência de um determinado transdutor (MELLO; KUBOTA, 2002; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003; LIN; JU, 2005).

A construção de um imunossensor é realizada através da imobilização de uma molécula de reconhecimento que pode ser o anticorpo ou o antígeno na superfície de um eletrodo e que será responsável por ligar-se à respectiva molécula complementar formando um imunocomplexo (complexo anticorpo-antígeno) como demonstrado na Figura 1. Esta interação gera algum tipo de mudança no meio que pode ser detectada e relacionada a concentração do antígeno ou anticorpo (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; FELIX; ANGNES, 2018).

Figura 1. Representação da formação do imunocomplexo.



Fonte: Própria (2018).

Os imunossensores podem ser classificados de acordo com a forma de transdução em ópticos, eletroquímicos, calorimétricos ou piezoelétricos. Para os eletroquímicos, a formação de um imunocomplexo pode ser acompanhada através de variações na corrente, potencial, impedância, condutância e capacitância de forma que forneça informações sobre o analito em estudo (LIN; JU, 2005; FELIX; ANGNES, 2018).

2.2.1 Imunossensores com marcação e sem marcação

Anticorpos e antígenos em geral não exibem comportamento eletroativo, portanto, para a realização de imunoensaios eletroquímicos são necessárias moléculas que sofrerão reações de oxidação e/ou redução no sistema, as sondas redox ou marcadores (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002).

Quanto à forma de montagem e funcionamento dos imunossensores eletroquímicos, podem ser aplicados dois métodos, o direto (sem marcação) ou o indireto (com marcação) (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002).

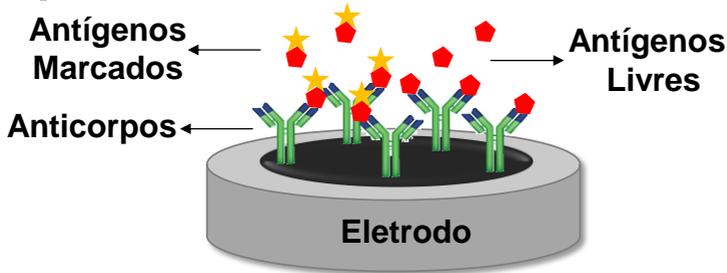
O imunoensaio, mais amplamente utilizado em análises clínicas e biológicas desde sua criação é o ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* – ELISA), que atua utilizando anticorpos ou antígenos marcados com enzimas. O ELISA pode ser aplicado utilizando técnicas como colorimetria, fluorescência, quimiluminescência e eletroquímica, através de métodos diretos ou indiretos (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012; ZAPP *et al.*, 2014).

Os tipos mais conhecidos de imunoensaios indiretos são o competitivo e o sanduíche, nos quais utiliza-se uma enzima que apresenta atividade redox frente a um substrato como molécula marcadora (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012).

No imunoensaio do tipo competitivo os anticorpos são imobilizados sobre um eletrodo, então, antígenos marcados e antígenos livres (analito presente na amostra) competem pelos sítios de ligação do anticorpo. O sinal obtido é referente ao marcador e será inversamente proporcional a quantidade de analito na amostra, como demonstrado na Figura 2. O procedimento inverso, com o antígeno imobilizado e anticorpo marcado também

pode ser utilizado (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012).

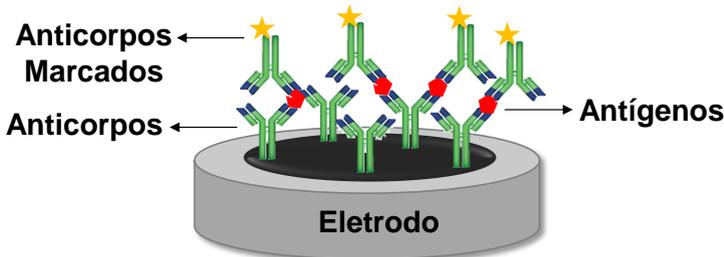
Figura 2. Representação do funcionamento de um imunoenensaio do tipo competitivo.



Fonte: Própria (2018).

No imunoenensaio do tipo sanduíche os anticorpos imobilizados reagem com o antígeno presente na amostra formando o imunocomplexo, sendo em seguida expostos a anticorpos marcados que se ligarão ao antígeno no imunocomplexo gerando um sinal referente ao marcador, diretamente proporcional a concentração do analito, como demonstrado na Figura 3. O procedimento inverso (antígeno-anticorpo-antígeno marcado) também pode ser aplicado (RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002; RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012).

Figura 3. Representação do funcionamento de um imunoenensaio do tipo sanduíche.



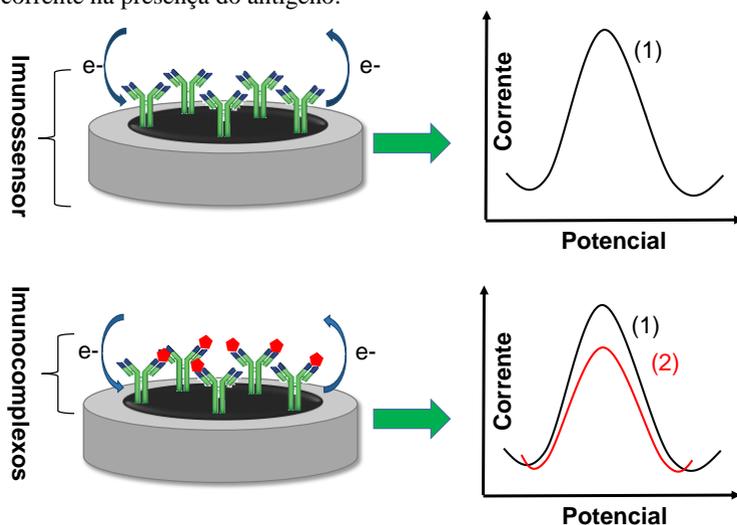
Fonte: Própria (2018).

O método direto ou sem marcação, do inglês *label-free*, baseia-se no bloqueio parcial da superfície eletroativa do sensor como forma de detecção. Anticorpos são imobilizados sobre o eletrodo e, ao entrar em contato com seu respectivo antígeno a

formação do imunocomplexo dificulta o fluxo de elétrons entre o eletrodo e a solução gerando uma supressão no sinal de corrente observado (ZAPP *et al.*, 2014; ZAPP, 2014; ZHANG, Y. *et al.*, 2016).

Para que o imunoenensaio direto seja aplicado é necessária a presença de uma sonda redox que pode estar imobilizada no eletrodo ou solubilizada no eletrólito suporte, sendo necessárias duas medições de corrente, uma na ausência de antígeno (pico base) e outra após contato com o antígeno. Quanto maior a supressão de corrente em relação ao pico base, maior a concentração de antígeno presente na amostra, neste caso o sinal obtido para a amostra é inversamente proporcional à concentração do analito, como ilustrado na Figura 4 (SILVA *et al.*, 2013; ZAPP *et al.*, 2014; ZAPP, 2014; ZHANG, Y. *et al.*, 2016).

Figura 4. Representação do funcionamento de um imunossensor voltamétrico sem marcação onde (1) é o pico base e (2) é a resposta de corrente na presença do antígeno.



Fonte: Própria (2018).

Imunossensores marcados apresentam uma sensibilidade elevada devido as características apresentadas pelo marcador utilizado, embora sejam necessárias mais etapas de lavagem e incubação aumentando o tempo de análise, além da disponibilidade comercial limitada e alto custo de anticorpos e

antígenos marcados. Imunossensores não-marcados apresentam maior simplicidade e baixo custo, sendo possível aumentar sua sensibilidade através de outros modificadores (ROGERS, 2000; LUPPA; SOKOLL; CHAN, 2001; RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012; SILVA *et al.*, 2013; ZHANG, J. *et al.*, 2016).

2.3 Técnicas eletroanalíticas

As técnicas eletroanalíticas baseiam-se em propriedades elétricas mensuráveis como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga para obter informações sobre propriedades intrínsecas das substâncias que podem ser relacionadas diretamente com a concentração de um analito em uma amostra (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; PACHECO *et al.*, 2013).

Estas técnicas utilizam dois ou mais eletrodos submersos em solução em uma célula de vidro, aplicando funções de potencial em função do tempo como rampa linear, pulsada ou senoidal. Possuem diversas aplicações em vários tipos de amostra como análises biomédicas e monitoramento ambiental, detectando analitos em ordens tão baixas quanto pico e nanomolar (SANDIFER, 2004; PACHECO *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2015).

2.3.1 Voltametria

As técnicas voltamétricas consistem na aplicação de um potencial de maneira controlada a um eletrodo indicador frente a um eletrodo de referência, ambos imersos em uma solução de eletrólito suporte, obtendo-se uma resposta de corrente referente à oxidação ou redução de uma espécie eletroativa em contato com o eletrodo indicador. Uma diferença de potencial é aplicada entre o eletrodo de referência, cujo potencial deve ser constante, e o eletrodo indicador, onde a reação a ser acompanhada acontece, gerando uma corrente entre o eletrodo indicador e um terceiro eletrodo, o eletrodo auxiliar (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003; PACHECO *et al.*, 2013). Os eletrodos encontram-se conectados a um potenciostato, que é responsável por amplificar o sinal obtido sendo transmitido a um computador onde pode-se observar um gráfico relacionando o potencial aplicado à corrente resultante, chamado voltamograma. A corrente obtida pode ser então relacionada a concentração do analito em questão (SOUZA;

MACHADO; AVACA, 2003; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003; PACHECO *et al.*, 2013; ELGRISHI *et al.*, 2018).

As técnicas voltamétricas pulsadas como voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD), funcionam através da aplicação de potencial em forma de pulsos, sendo a corrente medida ao final de cada pulso de maneira que ocorre uma minimização da corrente capacitiva; corrente gerada na interface eletrodo/solução devido à formação de uma dupla camada elétrica e que não é proporcional a concentração do analito. A VOQ apresenta maior velocidade de aquisição de dados em relação a VPD, e amostragem de corrente no sentido direto e reverso, enquanto que a VPD registra apenas um dos sentidos. Esta amostragem pode favorecer a obtenção de maiores sinais de corrente para reações reversíveis e quase reversíveis (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; PACHECO *et al.*, 2013).

A corrente capacitiva decresce exponencialmente com o tempo enquanto a corrente faradaica, proporcional a concentração da espécie sendo oxidada ou reduzida, decresce mais lentamente, esta minimização da contribuição da corrente capacitiva na amostragem da corrente total faz com que os limites de detecção obtidos sejam mais baixos, contando ainda com medidas realizadas em velocidade significativamente maior em relação às técnicas de aplicação linear de potencial, o que faz com que as técnicas pulsadas sejam consideradas extremamente convenientes para a análise de baixas concentrações (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; SOUZA *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2013).

2.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) utiliza a aplicação de sinais com pequenas variações periódicas de corrente alternada em uma vasta faixa de frequências possibilitando a caracterização de processos eletródicos e de interfaces complexas como a interface eletrodo-solução sendo capaz de fornecer informações sobre a interface estudada, sua estrutura e as reações que acontecem (LASIA, 2002; CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006).

Atualmente a EIS vem sendo muito utilizada como forma de caracterização da interação entre eletrodos quimicamente modificados com a solução, avaliando a transferência de carga nesta interface como forma de compreender a contribuição dos

modificadores aplicados à resposta geral do sensor (LASIA, 2002; CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006; BRONDANI *et al.*, 2017; BRUGNEROTTO *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2017; SMANIOTTO *et al.*, 2017; DELGADO *et al.*, 2018).

2.4 Nanomateriais

A imobilização do material responsável pela bioafinidade é de extrema importância para o desempenho do imunossensor. A aplicação de nanomateriais na construção de sensores eletroquímicos é bastante comum pois a sua presença é responsável por criar uma plataforma biocompatível, facilitando a imobilização de material biológico na superfície de sensores (ROGERS, 2000; FELIX; ANGNES, 2018).

Os materiais em nanoescala apresentam propriedades únicas devido ao alto número de sítios disponíveis para interações moleculares fornecidos por sua elevada área superficial (RÓZ *et al.*, 2017; FELIX; ANGNES, 2018). Nanomateriais são capazes de melhorar a resposta analítica obtida por um sensor devido a sua alta condutividade elétrica e efeito eletrocatalítico, além de possuírem propriedades térmicas, ópticas e reatividade pronunciadas. Alguns exemplos de nanomateriais são os pontos quânticos, *quantum rods*, nanopartículas metálicas e magnéticas, nanotubos e nanofios (VADDIRAJU *et al.*, 2010). Estas características podem favorecer a transferência de elétrons na interface eletrodo-solução ocasionando um aumento no sinal de corrente em relação ao eletrodo não modificado (VADDIRAJU *et al.*, 2010; RÓZ *et al.*, 2017; FELIX; ANGNES, 2018).

2.4.1 Nanoplaquetas esfoliadas de grafite

As nanoplaquetas esfoliadas de grafite (xGnP) são obtidas através da esfoliação do grafite, processo que pode envolver métodos químicos, mecânicos e térmicos com o objetivo de separar as camadas de grafeno que o formam (CHUNG, 2015). Consistem em estruturas bidimensionais de carbono hibridizado em sp^2 dispostas em multicamadas cuja sobreposição apresenta diversas bordas, acarretando em uma grande área superficial (SHANG *et al.*, 2008; ION, A. *et al.*, 2010; ION, I.; ION, A.; CULETU, 2011; CHUNG, 2015). Esta disposição apresenta um band gap pequeno

o que faz com que este material seja um excelente condutor térmico e elétrico (ION, I.; ION, A.; CULETU, 2011).

A aplicação de xGnP em sensores e biossensores eletroquímicos apresenta-se bastante vantajosa, uma vez que a alta condutividade elétrica e elevada área superficial do grafite faz com que a transferência de elétrons na interface eletrodo-solução seja facilitada, além de auxiliar na imobilização de biomoléculas. Diversos trabalhos apresentam a aplicação de xGnP para o aprimoramento do sinal obtido pelo sensor (LU *et al.*, 2007; ION, A. *et al.*, 2010; ION, I.; ION, A.; CULETU, 2011; ZANATO *et al.*, 2017; SILVA; SMANIOTTO; VIEIRA, 2017; EVTUGYN; HIANIK, 2018).

As xGnP são frequentemente comparadas com nanotubos de carbono (CNTs) por apresentarem propriedades similares (SHANG *et al.*, 2008; ION, I.; ION, A.; CULETU, 2011). Apesar da maior sensibilidade e estabilidade oferecida pelos CNTs, estes possuem resíduos de metais provenientes do seu crescimento catalítico que podem prejudicar a reprodutibilidade de experimentos (ALWARAPPAN *et al.*, 2009). As xGnP destacam-se por serem obtidas mais facilmente e com menor custo (SHANG *et al.*, 2008; ION, I.; ION, A.; CULETU, 2011).

2.4.2 Nanopartículas metálicas

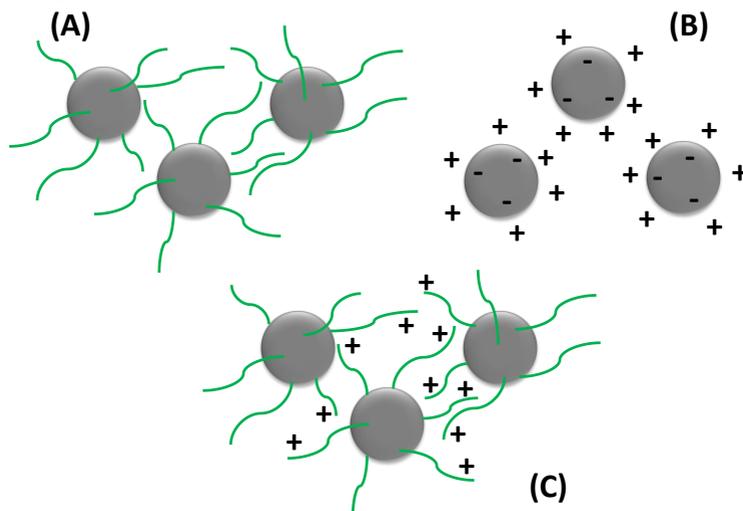
As nanopartículas metálicas têm sido amplamente utilizadas como modificadores em sensores eletroquímicos pois apresentam alta estabilidade química, biocompatibilidade e alta área superficial, características capazes de aprimorar o desempenho e aplicabilidade do sensor (WAN *et al.*, 2013; KOKKINOS; ECONOMOU; PRODRMIDIS, 2016).

Na construção de sensores eletroquímicos, nanopartículas metálicas podem ser utilizadas como catalisadores, facilitando a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e biomoléculas, marcadores enzimáticos, centros de nucleação para deposição de metais ou ainda como plataformas imobilizadoras de biomoléculas. Esta importante função é capaz de promover um ambiente biocompatível para a adsorção de biomoléculas como enzimas e anticorpos na superfície do sensor aumentando seu desempenho analítico (MERKOÇI, 2013; KOKKINOS; ECONOMOU; PRODRMIDIS, 2016; ZANATO *et al.*, 2017).

As nanopartículas metálicas mais frequentemente utilizadas na construção de sensores são partículas de prata, ouro ou platina com diâmetro de 1 a 100 nm (CAMPBELL; COMPTON, 2010; MODY *et al.*, 2010). Uma das formas mais comumente empregadas para a síntese de nanopartículas metálicas é a redução de um sal do metal na presença de um agente estabilizante. Variações de estabilizante e temperatura da síntese podem acarretar na geração de diferentes dimensões de nanopartículas que apresentam propriedades características de seu tamanho como maior afinidade com determinadas biomoléculas e propriedades ópticas diferenciadas (CAMPBELL; COMPTON, 2010; MODY *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2012).

Para que as nanopartículas metálicas mantenham as propriedades características de suas dimensões é necessária a presença de um estabilizante, responsável por evitar a agregação do material que é favorecida termodinamicamente devido a sua alta energia superficial (KRAYNOV; MÜLLER, 2011; MELO *et al.*, 2012). A estabilização das nanopartículas pode ser realizada através de efeito estérico, eletrostático, ou ainda uma combinação de ambos, o efeito eletroestérico, conforme ilustrado na Figura 5. Os polímeros são muito utilizados como estabilizantes pois a presença destas macromoléculas faz com que as nanopartículas mantenham-se dispersas no solvente através de impedimento estérico, ou no caso de polímeros carregados, eletroestérico (FRITZ *et al.*, 2002; KRAYNOV; MÜLLER, 2011; MELO *et al.*, 2012). Uma escolha adequada destes, pode trazer ainda um aumento de seletividade e estabilidade ao biossensor. Alguns exemplos de polímeros aplicados a estabilização de nanopartículas em sensores são Nafion, polietilenoimina (PEI) e hidrocloreto de polialiamina (PAH) (KRAYNOV; MÜLLER, 2011; XING *et al.*, 2011; BRONDANI *et al.*, 2013; SILVA; VIEIRA, 2016).

Figura 5. Representação de nanopartículas (círculos) estabilizadas através da adsorção de polímeros (estruturas verdes) e cargas em sua superfície através de (A) efeito estérico, (B) efeito eletrostático e (C) efeito eletroestérico.



Fonte: Própria (2018).

2.5 Cianotoxinas

Cianobactérias ou algas azuis são bactérias fotossintetizantes que compartilham algumas características com algas e encontram-se presentes em diversos ecossistemas aquáticos desde lagos e mares até reservatórios de água para distribuição. Com registros de ocorrências no mundo todo, as cianobactérias têm sua proliferação favorecida em águas, tanto doces quanto salgadas, em condições de eutrofização devido à abundância de nutrientes como fosfato e nitrato, muitas vezes por origem antropogênica (PALINSKA; SUROSZ, 2014; GURBUZ *et al.*, 2016; ZHANG, Z. *et al.*, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Durante sua floração, as cianobactérias produzem metabólitos secundários, substâncias tóxicas chamadas cianotoxinas que podem ser classificadas como neurotóxicas, hepatotóxicas, citotóxicas e dermatotóxicas (LA CRUZ; LYNCH; DIONYSIOU, 2012; CHEN *et al.*, 2016). Ao serem liberadas na água representam riscos para a saúde dos animais e seres humanos

que têm contato com estas águas (LA CRUZ; LYNCH; DIONYSIOU, 2012; CHEN *et al.*, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Dentre as cianotoxinas destacam-se as microcistinas (MCs) devido à promoção de elevado dano hepático e renal, sendo capazes de gerar ainda dano celular devido ao estresse oxidativo das células (GURBUZ *et al.*, 2016; MASH; WITTKORN, 2016). A exposição crônica a estas toxinas pode levar ao crescimento de tumores e gastroenterite, considerando-as assim, um dos grupos mais perigosos (MASH; WITTKORN, 2016).

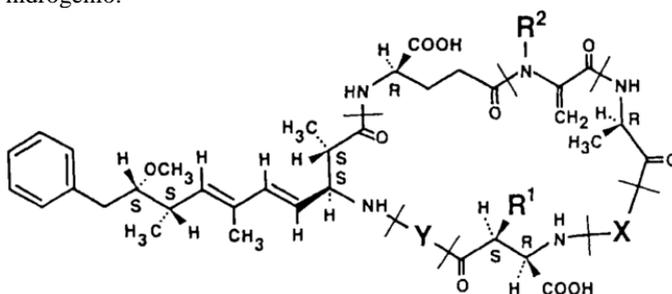
A intoxicação por MCs acontece principalmente através da ingestão de células de cianobactérias presentes em água contaminada ou de organismos aquáticos provenientes destas águas. Animais marinhos como moluscos, camarões e peixes são bioacumuladores destas substâncias podendo transferi-las para níveis tróficos mais altos fornecendo maior risco de contaminação para os seres humanos (POURIA *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2016; FRANCY *et al.*, 2016; GURBUZ *et al.*, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Estudos apontam que a exposição prolongada e frequente à ingestão de MCs pode gerar efeitos tóxicos crônicos (ZHANG *et al.*, 2009). Outra forma minoritária de exposição ocorre pela inalação, comumente em atividades recreacionais (CHEN *et al.*, 2016; FRANCY *et al.*, 2016).

No entanto, o incidente mais severo de intoxicação de seres humanos por MCs aconteceu em 1996 na cidade de Caruaru – Pernambuco no Brasil, através de exposição intravenosa. Neste evento, que foi o primeiro registro de letalidade em humanos, dentre 131 pacientes, 100 desenvolveram falência hepática aguda e 76 foram a óbito devido a terem sido submetidos à hemodiálise em uma clínica que obteve água de reservatório que apresentava crescimento de cianobactérias, 52 destes pacientes tiveram sua morte confirmada como intoxicação por MCs, o que ficou conhecido como Síndrome de Caruaru (CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002; YUAN; CARMICHAEL; HILBORN, 2006; CHEN *et al.*, 2016).

Existem mais de 85 variantes de MCs conhecidas cuja estrutura se baseia em um heptapeptídeo cíclico contendo dois aminoácidos modificados: ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4(E),6(E)-decadienoico (ADDA), e metildehidroalanina (MDHA) e dois L-aminoácidos variáveis cuja sigla é responsável pela identificação da MC, como observado na Figura 6 onde as

posições X e Y pertencem aos aminoácidos variáveis e R1 e R2 podem ser grupos metil ou hidrogênio (CHEN *et al.*, 2016; MASH; WITTKORN, 2016). A estrutura das MCs faz com que elas sejam quimicamente estáveis e possam persistir no ambiente por vários meses (CHEN *et al.*, 2016). No organismo dos pacientes que sofreram a Síndrome de Caruaru foram encontradas as microcistinas YR, LR e AR (POURIA *et al.*, 1998; CARMICHAEL *et al.*, 2001).

Figura 6. Estrutura geral das microcistinas onde as posições X e Y pertencem aos aminoácidos variáveis e R¹ e R² podem ser grupos metil ou hidrogênio.

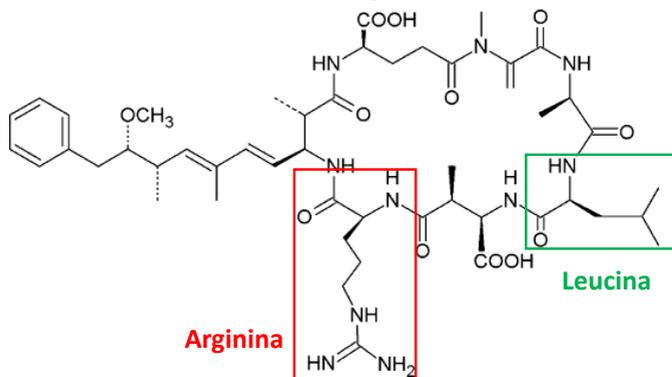


Fonte: Adaptado de Carmichael (1997).

2.5.1 Microcistina-LR

A microcistina-LR (MCLR) possui os aminoácidos leucina (L) e arginina (R) na sua estrutura, conforme visualizado na Figura 7, recebendo o sufixo LR ao nome para identificação (MASH; WITTKORN, 2016).

Figura 7. Estrutura da MCLR com destaque para os L-aminoácidos que a identificam: leucina (L) em verde e arginina (R) em vermelho.



Fonte: Adaptado de Žegura; Štraser; Filipič (2011).

A MCLR foi a primeira microcistina quimicamente identificada sendo uma das variantes mais abundantes encontrada no meio ambiente, considerada altamente tóxica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; ZHANG, W. *et al.*, 2017). A toxicidade da MCLR se deve à inibição das proteínas fosfatases serina/treonina 1 e 2A (PP1 e PP2A) que gera um aumento na fosforilação de proteínas, ruptura de filamentos de queratina e dano à ultraestrutura hepática o que pode levar o indivíduo afetado a óbito por choque hemorrágico ou falência hepática (CARMICHAEL, 1997; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; ZHANG, W. *et al.*, 2017).

Devido à gravidade do incidente de 1996, o Ministério da Saúde estabeleceu a partir do decreto 1469 de Dezembro de 2000 a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas no Brasil de acordo com os níveis e técnicas estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em seu guia publicado em 1998 que estabelece o limite provisório de MCLR em água potável como $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e ingestão diária máxima de $0,04 \text{ } \mu\text{g}$ de MCLR por kg de peso corporal (BRASIL, 2000; VIEIRA *et al.*, 2005; ZHANG, J., 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; ZHANG, Y. *et al.*, 2017). Esta é a única cianotoxina para a qual foi possível estabelecer um limite específico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Encontram-se disponíveis comercialmente kits de ELISA para detecção de MCs em amostras de água, sendo a opção mais

simples e econômica atualmente apesar de possuir algumas limitações em relação à seletividade (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014; HOU *et al.*, 2016). O uso de cromatografia líquida de alta performance com espectrometria de massas (HPLC/MS) é considerado o método mais confiável para análises devido à correção do efeito de matriz (ZHANG, J. *et al.*, 2010; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014). É possível utilizar ainda ensaios de inibição de proteína fosfatase (PPIA) e cromatografia líquida de alta performance com detecção ultravioleta-visível (HPLC/UV-Vis) ou arranjo de fotodiodos (HPLC/PDA), estas técnicas embora sejam bem aceitas, exigem equipamentos de alto custo, pré-tratamentos demorados e operadores especializados, o que demanda uma busca pelo desenvolvimento de métodos simples, seletivos, de baixo custo, rápidos e portáteis como os imunossensores eletroquímicos (ZHANG, J. *et al.*, 2010; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2014; HOU *et al.*, 2016).

Atualmente um número crescente de imunossensores eletroquímicos para quantificação de MCLR tem sido reportado na literatura aplicando diversos nanomateriais como nanopartículas metálicas, nanocompósitos e nanomateriais de carbono na busca por uma detecção cada vez mais sensível e seletiva (GAN *et al.*, 2016, HOU *et al.*, 2016, ZHANG J. *et al.*, 2016, ZHAO *et al.*, 2016, ZHANG; XIONG; CHEN, 2017, ZHANG Y. *et al.*, 2017, PANG *et al.*, 2018, TALAMINI *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um imunossensor voltamétrico *label-free* para detecção de MCLR em água do mar por meio da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com xGnP, nanopartículas de prata (AgNP) e anticorpos (anti-MCLR).

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de prata (AgNP) em diferentes estabilizantes e escolher a síntese mais adequada para a construção do imunossensor;
- Caracterizar os nanomateriais através de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (SEM-FEG), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), potencial zeta e espectrometria UV-Vis;
- Avaliar as respostas do imunossensor para MCLR usando VOQ e VPD;
- Otimizar os parâmetros da técnica voltamétrica selecionada;
- Otimizar as proporções de xGnP e AgNP;
- Estudar a imobilização de anti-MCLR;
- Otimizar o pH do eletrólito suporte;
- Caracterizar o sistema através de EIS e VOQ;
- Construir curva de calibração para MCLR;
- Estudar os possíveis interferentes nas amostras de água do mar;
- Avaliar a repetibilidade entre as medidas dos imunossensores;
- Avaliar a estabilidade do imunossensor proposto;
- Quantificar MCLR em amostra de água do mar fortificada utilizando o imunossensor proposto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e materiais

Os reagentes utilizados foram de grau analítico sem purificação adicional. Todas as dispersões e soluções aquosas foram preparadas em água ultrapura purificada em sistema Milli-Q® (Millipore) com resistividade de 18,2 MΩ cm à temperatura ambiente (≈ 25 °C).

As soluções de eletrólito suporte, tampão fosfato salino (PBS) 0,01 mol L⁻¹ em pHs 7,0, 7,4, 8,0 e 9,0 foram preparadas a partir da dissolução dos sais cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) e hidrogenofosfato dissódico (Na₂HPO₄) em água ultrapura e foram ajustadas para os respectivos pHs com soluções de hidróxido de sódio e ácido fosfórico. Os reagentes utilizados foram adquiridos de fontes comerciais (Sigma-Aldrich, Synth e Vetec).

A solução de Fe(CN)₆^{3-/4-} 5 mmol L⁻¹ foi preparada a partir de hexacianoferrato (III) de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) e hexacianoferrato (II) de potássio (K₄[Fe(CN)₆]), ambos da Sigma-Aldrich, em solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹.

As soluções dos sais utilizados no estudo dos possíveis interferentes foram preparadas nas seguintes concentrações: cloreto de sódio (0,4 mol L⁻¹), sulfato de sódio (0,03 mol L⁻¹), cloreto de cálcio (1,3 x 10⁻³ mol L⁻¹), cloreto de potássio (9,4 x 10⁻³ mol L⁻¹), bicarbonato de sódio (2,4 x 10⁻³ mol L⁻¹) e brometo de potássio (8,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), todos os reagentes obtidos da Sigma-Aldrich.

As soluções de MCLR em diversas concentrações e anti-MCLR na concentração 100 µg mL⁻¹ foram preparadas em PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4 a partir dos respectivos padrões, MCLR 100 µg mL⁻¹ (Enzo Life Sciences) e anti-MCLR 2 mg mL⁻¹ (abcam).

Para a síntese das nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion (AgNP-Nafion), BSA (albumina de soro bovino) (AgNP-BSA) e heparina (AgNP-Hep) foram utilizadas soluções aquosas de Nafion 0,5 % (m/v), BSA 0,5 % (m/v) (ambos da marca Sigma-Aldrich) e heparina 0,5 % (m/v) (Bioibérica), além de nitrato de prata (Cennabras) 0,1 mol L⁻¹ e borohidreto de sódio (Nuclear) 0,02 mol L⁻¹ (solução recém preparada com água ultrapura gelada).

As xGnP utilizadas foram obtidas da XG Sciences, Inc. e possuem diâmetro médio de aproximadamente 5 μm e espessura na faixa de 6 - 8 nm (dados fornecidos pelo fabricante).

Os eletrodos utilizados para a construção do imunossensor foram eletrodos de carbono vítreo (GCE) obtidos da Metrohm, com diâmetro de 2,0 mm.

4.2 Instrumentação

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro (Micronal, modelo B-475) equipado com um eletrodo de vidro combinado. As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm) em um espectrofotômetro Agilent G6860A Cary 60 UV-Vis. Um banho de ultrassom Cristófoli foi utilizado para o preparo das dispersões de xGnP e limpeza dos GCE.

A aplicação do teste *t* de Student foi realizada através do software Statistica.

A caracterização morfológica da superfície do sensor foi feita por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (FEG-SEM) em um equipamento JEOL JSM-6701F (Japão), operando com uma tensão de aceleração de 5,0 kV e através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizando o equipamento JEOL JEM-2100, operando a 100 kV. Ambos os tipos de microscopia foram realizados no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME – UFSC, Florianópolis, Brasil). As medidas de potencial zeta para as AgNP foram obtidas utilizando um instrumento multiusuário Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) localizado no Laboratório de Catálise Biomimética (LaCBio), Departamento de Química da UFSC.

Para a realização das medidas voltamétricas e dos experimentos de EIS utilizou-se um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 204 com módulo FRA conectado a um computador equipado com o software de processamento de dados NOVA versão 1.10. As análises foram realizadas em um sistema contendo três eletrodos, referência, auxiliar e indicador, inseridos em uma célula de vidro com capacidade para 20,0 mL. Como referência foi utilizado um eletrodo Ag/AgCl (KCl 3,5 mol L⁻¹), como auxiliar foi utilizado um eletrodo de placa de platina (0,5

cm²) e como indicador o imunossensor proposto. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

4.3 Metodologia

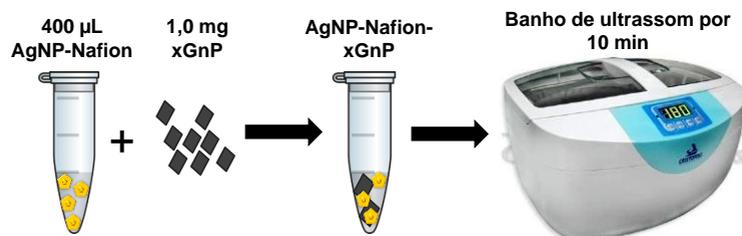
4.3.1 Síntese das nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion, BSA e heparina

Para a síntese das AgNP-Nafion foram preparados 10 mL de solução de Nafion 0,5 % (m/v) aos quais foram adicionados sob agitação 100 µL de solução aquosa de nitrato de prata 0,1 mol L⁻¹. Em seguida foram adicionados 200 µL de uma solução de borohidreto de sódio 0,02 mol L⁻¹. A dispersão foi mantida sob agitação durante 30 min à temperatura ambiente ou a 45 °C, baseado nas sínteses propostas por Reduan, Ghazali e Jamari (2016). Analogamente foram realizadas as sínteses das AgNP-BSA, e AgNP-Hep substituindo apenas a solução de Nafion por BSA 0,5 % (m/v) ou heparina 0,5 % (m/v).

4.3.2 Preparo da dispersão de nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion e nanoplaquetas esfoliadas de grafite

A dispersão de nanopartículas de prata estabilizadas em Nafion e nanoplaquetas esfoliadas de grafite (AgNP-Nafion-xGnP) foi preparada adicionando a um eppendorf 1,0 mg de xGnP e 400 µL de AgNP-Nafion. Em seguida a dispersão foi submetida a banho de ultrassom por 10 min. A preparação desta etapa encontra-se ilustrada na Figura 8.

Figura 8. Representação da preparação da dispersão de AgNP-Nafion e xGnP.



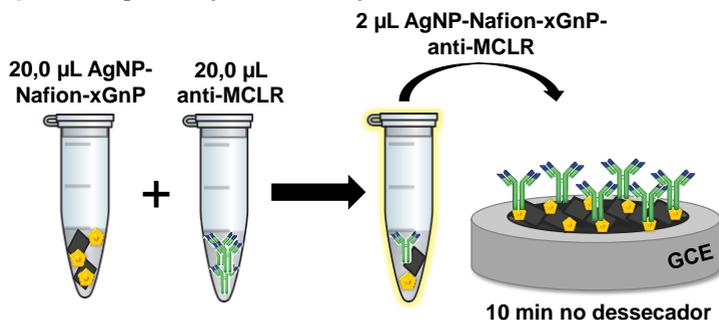
Fonte: Própria (2018).

4.3.3 Construção do imunossensor

A preparação da superfície do GCE utilizado na construção do imunossensor se deu através de polimento mecânico utilizando uma suspensão aquosa de alumina (granulometria de $0,05 \mu\text{m}$) sobre feltro, fazendo movimentos em forma de oito (8), durante 1 minuto. As partículas residuais de alumina foram removidas através de lavagem com água ultrapura e banho de ultrassom com água ultrapura durante 10 min.

Após realizada a limpeza da superfície do GCE, foram misturados em um eppendorf $20,0 \mu\text{L}$ da dispersão de AgNP-Nafion-xGnP e $20,0 \mu\text{L}$ da solução de anti-MCLR. A mistura foi mantida em agitação mecânica por 10 min para uma eficiente adsorção dos anticorpos no nanomaterial. Uma alíquota de $2,0 \mu\text{L}$ da dispersão AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR foi depositada sobre a superfície do GCE com o auxílio de uma micropipeta sendo em seguida realizada a secagem deste material em dessecador por 10 min como ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Representação da construção do imunossensor.



Fonte: Própria (2018).

4.3.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em célula de vidro contendo $15,0 \text{ mL}$ de eletrólito suporte (PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; pH 9,0). Os voltamogramas foram registrados após homogeneização da solução por agitação mecânica durante 60 segundos. As medidas de VOQ foram obtidas na faixa de potencial de $-0,5$ a $+0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ($3,5 \text{ mol L}^{-1}$) com frequências de 20

a 80 Hz, amplitude de 10 a 100 mV e incremento de varredura de 2 a 10 mV.

Os experimentos de EIS foram realizados utilizando solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 5 mmol L^{-1} como sonda eletroquímica em circuito aberto com amplitude de 10 mV e faixa de frequências de 0,1 a 100000 Hz.

4.3.5 Obtenção da amostra e quantificação de MCLR

A amostra de água do mar foi obtida na praia de Jurerê em Florianópolis – Santa Catarina e fortificada com solução padrão de MCLR obtendo a concentração de $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para simular uma amostra contaminada. Para a quantificação da toxina na amostra, uma alíquota de $2 \text{ }\mu\text{L}$ da solução contendo água do mar foi depositada sobre o imunossensor e incubada por 10 min sendo então realizadas as medidas de VOQ em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

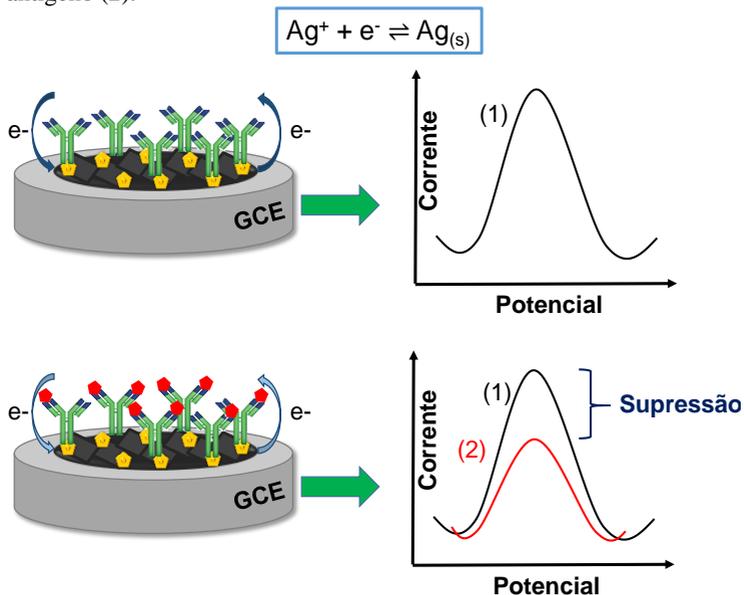
5.1 Princípio de funcionamento do imunossensor

O imunossensor construído (AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE) funciona da seguinte maneira: após a construção e secagem, foi realizada lavagem com solução de PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0) contendo 1% de BSA para o bloqueio de sítios não específicos. Em seguida, o AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE foi submerso no eletrólito suporte (PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0) para a obtenção do pico de oxidação da prata (equação de reação apresentada na Figura 10) presente no filme (pico base). Após a obtenção do pico base o imunossensor foi retirado da célula e $2 \mu\text{L}$ da solução padrão de MCLR ou amostra foram depositados em sua superfície e incubados por 10 min, nesta etapa as moléculas de antígeno presentes na solução se ligam aos anticorpos presentes no filme formando imunocomplexos. Após a etapa de incubação o imunossensor foi lavado vigorosamente com solução de PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 9,0) para remover moléculas de proteína que possam ter se adsorvido fracamente ou reversivelmente ao imunossensor.

Para a quantificação do analito, após incubação, foi realizada uma nova medida da corrente resultante da oxidação da prata. A presença do analito bloqueia parcialmente a superfície eletroativa do imunossensor gerando uma supressão do sinal em relação ao pico base, de forma que quanto maior a concentração de MCLR menor será o valor de corrente obtido. Portanto, a porcentagem de supressão da corrente é proporcional à concentração do analito na solução analisada.

O esquema representando o funcionamento do imunossensor encontra-se ilustrado na Figura 10 onde (1) é o pico de oxidação da prata na ausência de antígeno e (2) é o pico de oxidação da prata na presença de antígeno.

Figura 10. Equação de oxidação da prata e proposta de funcionamento do imunossensor representando na primeira etapa obtenção do pico base (1) e na segunda etapa obtenção da resposta de corrente na presença do antígeno (2).



Fonte: Própria (2018)

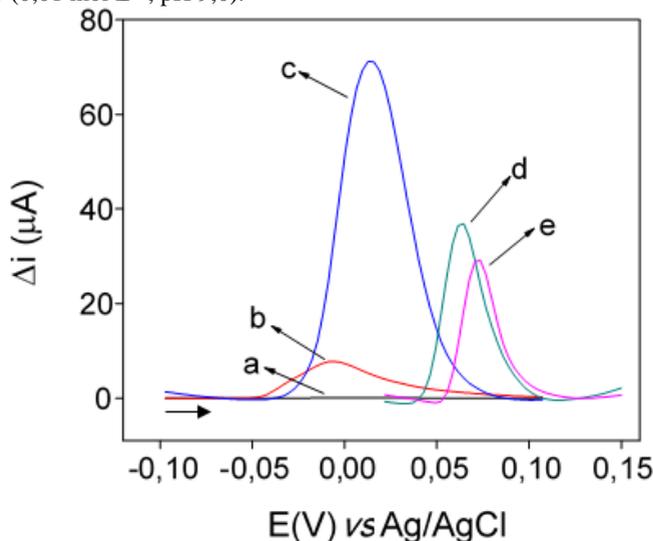
5.2 Comportamento eletroquímico

A contribuição de cada modificador a ser utilizado na construção do imunossensor proposto foi avaliada através de VOQ e EIS.

Na Figura 11 encontram-se os voltamogramas de VOQ em PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 9,0) obtidos para (a) GCE limpo, que não apresenta nenhum sinal devido à ausência de sonda redox, (b) AgNP-Nafion/GCE, na presença das AgNP pode-se observar uma pequena resposta de corrente referente à oxidação da prata, (c) AgNP-Nafion-xGnP/GCE, onde houve uma maximização altamente significativa da resposta de corrente devido à natureza condutora das xGnP, o que justifica a utilização deste material, (d) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE, onde ocorre uma diminuição na resposta de corrente devido ao bloqueio parcial da superfície eletroativa pelas moléculas de anticorpo, o que significa que os anticorpos foram imobilizados no nanomaterial com

sucesso e, o voltamograma (e) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/MC-LR/GCE apresenta uma redução na resposta de corrente devido à adição de 2 μL de solução de MCLR na concentração 1,0 ng mL^{-1} , que ao interagir com os anticorpos do imunossensor proposto forma imunocomplexos, também gerando bloqueio parcial da superfície do imunossensor.

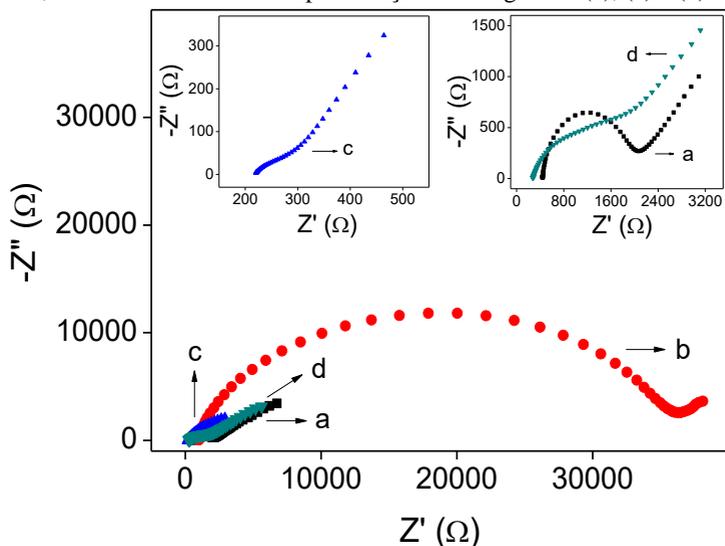
Figura 11. Voltamogramas de VOQ para (a) GCE limpo, (b) AgNP-Nafion/GCE, (c) AgNP-Nafion-xGnP/GCE e (d) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE (e) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/MC-LR/GCE em PBS (0,01 mol L^{-1} , pH 9,0).



As medidas de EIS foram realizadas em solução de KCl 0,1 mol L^{-1} contendo 5 mmol L^{-1} $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, em circuito aberto, utilizando os parâmetros 10 mV de amplitude e faixa de frequências de 0,1–100000 Hz para avaliar a resistência à transferência de carga (R_{ct}) oferecida pelos modificadores do imunossensor. Na Figura 12 encontram-se as medidas realizadas para (a) GCE limpo, obtendo R_{ct} de 1590,01 Ω , (b) AgNP-Nafion/GCE apresentando um grande aumento no valor da R_{ct} para 35289,17 Ω que se deve à presença do material polimérico que apresenta baixa condutividade dificultando a transferência de carga, (c) AgNP-Nafion-xGnP/GCE obtendo a menor R_{ct} : 40,91 Ω , esta grande redução no valor se deve à capacidade das xGnP de facilitar a transferência de carga e (d) AgNP-Nafion-xGnP-anti-

MCLR/GCE obtendo R_{ct} de $1543,98 \Omega$ devido à presença dos anticorpos que ao serem imobilizados dificultam a passagem de cargas.

Figura 12. Diagramas de Nyquist obtidos para (a) GCE limpo, (b) AgNP-Nafion/GCE, (c) AgNP-Nafion-xGnP/GCE e (d) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$, circuito aberto, 10 mV de amplitude e faixa de frequências de $0,1-100000 \text{ Hz}$. Inserido: aproximação dos diagramas (c), (a) e (d).



Os resultados obtidos através de EIS corroboram com os obtidos através de VOQ, uma vez que os modificadores que geraram maior resposta de corrente também apresentaram menores R_{ct} .

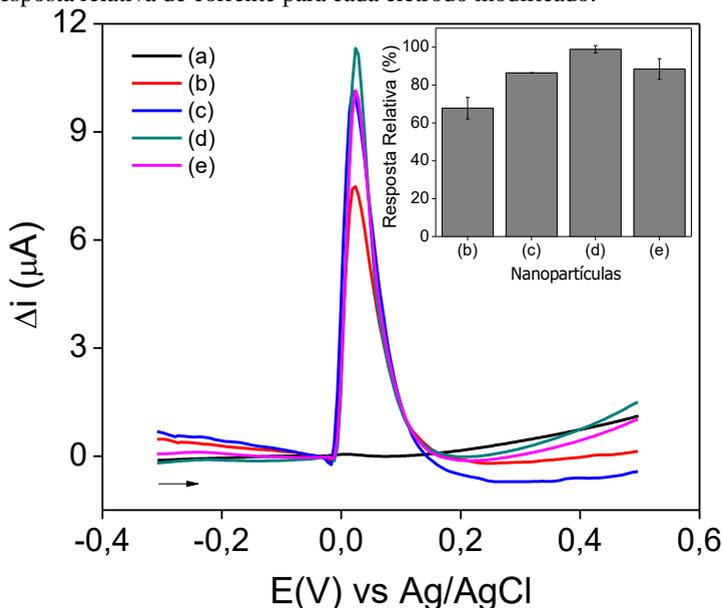
5.3 Otimização da síntese das nanopartículas

Foi realizado um estudo para escolher a síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) mais adequada para a construção do imunossensor. As AgNPs foram sintetizadas e utilizadas na construção do imunossensor proposto com a função de atuar como plataforma imobilizadora dos anticorpos e também como sonda redox responsável pela resposta eletroquímica do imunocomplexo formado. Portanto, para que estas funções sejam desempenhadas

com êxito é importante que o filme formado na superfície do eletrodo seja uniforme e estável.

Inicialmente, foram selecionadas soluções 0,5% (m/v) de heparina, BSA e Nafion como estabilizantes em duas temperaturas, ambiente (25 °C) e 45 °C e avaliadas quanto ao melhor desempenho na síntese das AgNPs para a construção do imunossensor. As sínteses utilizando as seis soluções resultaram em dispersões amarelas. Após o resfriamento, 2 μL de cada dispersão foram depositadas sobre a superfície limpa dos eletrodos de carbono vítreo e transferidos para um dessecador sob vácuo. Em seguida, foram realizadas medidas e os voltamogramas de onda quadrada obtidos estão representados na Figura 13, onde (a) representa o GCE sem modificação, (b) GCE modificado com AgNP-Nafion (45 °C), (c) AgNP-Nafion (25 °C), (d) AgNP-BSA (25 °C) e (e) AgNP-BSA (45 °C). Para as sínteses utilizando heparina como estabilizante não foi possível obter voltamogramas, pois o filme formado desprende-se da superfície do eletrodo.

Figura 13. Voltamogramas obtidos para (a) GCE, (b) GCE modificado com AgNP-Nafion (45 °C), (c) AgNP-Nafion (25 °C), (d) AgNP-BSA (25 °C), (e) AgNP-BSA (45 °C) em PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4). Inseto: resposta relativa de corrente para cada eletrodo modificado.



A maior resposta de corrente observada foi obtida com o filme formado pelas AgNP-BSA sintetizadas à 25 °C ($p < 0,05$ para teste t), enquanto que as AgNP-BSA sintetizadas à 45 °C e AgNP-Nafion sintetizadas à 25 °C não apresentaram diferença estatística entre si para as respostas de corrente obtidas ($p > 0,05$ para teste t). As variações de temperatura e estabilizante em cada síntese são responsáveis pela mudança no formato, tamanho e nível de dispersão das nanopartículas sendo estas particularidades responsáveis pelas diferentes respostas de corrente obtidas.

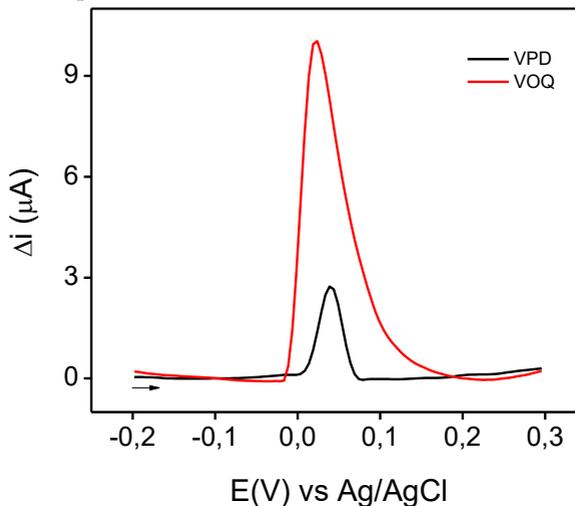
Foi possível observar ainda que as dispersões sintetizadas a 25 °C apresentaram pequenos sinais de precipitação após cerca de 8 meses sob refrigeração enquanto que as sintetizadas a 45 °C permaneceram estáveis por tempo indeterminado.

A dispersão escolhida para utilização na construção do imunossensor foi a AgNP-Nafion sintetizada à temperatura ambiente, pois demonstrou uma boa resposta de corrente e apresentou maior resistência à lixiviação do filme formado na superfície do eletrodo frente a diversas lavagens e medidas consecutivas. Para os filmes formados pelas AgNP-BSA foi observado desprendimento da superfície do eletrodo após cerca de 4 medidas voltamétricas, enquanto que para as AgNP-Nafion não foi observado desprendimento do filme mesmo após 10 medidas.

5.4 Escolha da técnica voltamétrica

As técnicas voltamétricas mais sensíveis utilizadas para a quantificação de analitos são as técnicas pulsadas VOQ e VPD. Ambas as técnicas foram selecionadas para otimização da melhor resposta de corrente do eletrodo modificado com o filme AgNP-Nafion para este sistema. A Figura 14 mostra os voltamogramas obtidos para o eletrodo modificado com AgNP-Nafion utilizando VOQ com os parâmetros: frequência 50 Hz, incremento 5 mV e amplitude 50 mV e VPD com os parâmetros: intervalo de tempo 50 ms, incremento 5 mV e amplitude 25 mV indicando que a resposta obtida para a VOQ apresentou-se cerca de três vezes superior à obtida através de VPD sendo portanto selecionada como a técnica a ser utilizada no desenvolvimento desse trabalho.

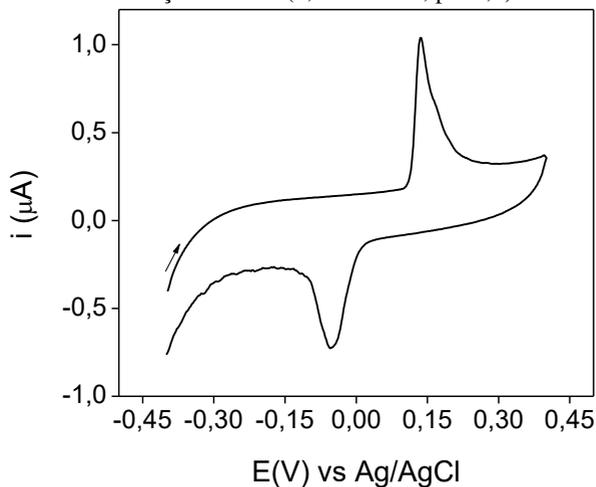
Figura 14. Voltamogramas obtidos para o eletrodo modificado com AgNP-Nafion utilizando VOQ (parâmetros: frequência 50 Hz, incremento 5 mV e amplitude 50 mV) e VPD (parâmetros: intervalo de tempo 50 ms, incremento 5 mV e amplitude 25 mV) em solução de PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4).



Na VOQ a resposta de corrente obtida é a soma dos picos de oxidação e redução do sistema, enquanto que na VPD apenas uma das reações é registrada.

Através de uma medida de voltametria cíclica realizada utilizando o filme formado pelas AgNP-Nafion foi possível observar a presença de um pico anódico bem definido referente à oxidação da prata em + 0,14 V e um pico catódico referente à redução da prata em - 0,05 V vs. Ag/AgCl, conforme o voltamograma apresentado na Figura 15. Devido a presença de ambos os picos voltamétricos para esta reação a resposta obtida através de VOQ foi maior do que a obtida através de VPD.

Figura 15. Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo modificado com AgNP-Nafion em solução de PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4).

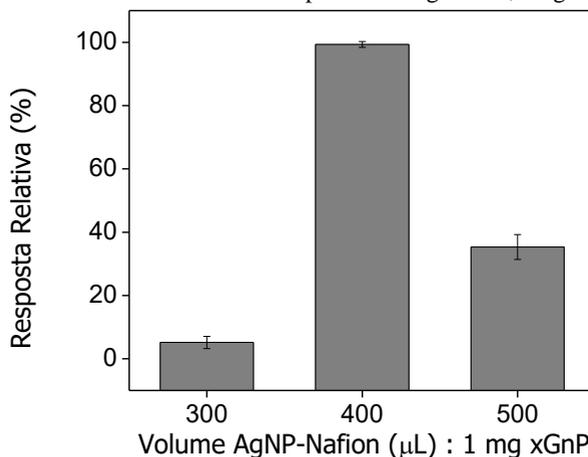


5.5 Otimização da quantidade de xGnP e AgNP-Nafion

A presença de xGnPs em sensores eletroquímicos fornece um aumento na resposta de corrente devido as excelentes propriedades condutoras deste material fornecidas por sua elevada área superficial, o que permite menores limites de detecção e amplificação da faixa de trabalho como observado por Lu e colaboradores (2007), Ion e colaboradores (2010) e Silva, Smaniotto e Vieira (2017).

Com o objetivo de tornar o imunossensor mais sensível e disponível para uma ampla faixa de trabalho, foram adicionadas como modificadores as xGnP. Para tal, a relação entre o volume de AgNP-Nafion utilizado para uma quantidade fixa de xGnP foi otimizada afim de escolher a melhor resposta para o imunossensor. Para este estudo $1,0 \text{ mg}$ de xGnP foi adicionado a eppendorfs contendo 300 , 400 e $500 \text{ } \mu\text{L}$ de AgNP-Nafion, sendo em seguida submetidos a banho de ultrassom por 10 min . Uma alíquota de $2 \text{ } \mu\text{L}$ da dispersão de AgNP-Nafion-xGnP foi depositada sobre a superfície do GCE e os voltamogramas foram obtidos. A resposta relativa de corrente para cada volume encontra-se na Figura 16.

Figura 16. Resposta relativa obtida para as medidas de corrente realizadas em solução de PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) utilizando o filme formado pela mistura de diferentes volumes de dispersão de AgNP e 1,0 mg de xGnPs.



É possível observar através da Figura 16 que inicialmente ao diminuir o volume de AgNP-Nafion de 500 μL para 400 μL o aumento da concentração de xGnPs acarretou em um acréscimo da resposta de corrente, devido à alta condutividade das xGnP. Entretanto, a redução do volume de AgNP-Nafion para 300 μL fez com que a resposta de corrente decaísse, possivelmente devido à aglomeração das xGnPs que desta forma não permitem o aumento da área superficial eletroativa de maneira efetiva. (LU *et al.*, 2007)

O volume de 400 μL de AgNP-Nafion para 1,0 mg de xGnP proporcionou a maior resposta de corrente quando aplicado ao GCE, sendo escolhido para utilização na construção do imunossensor.

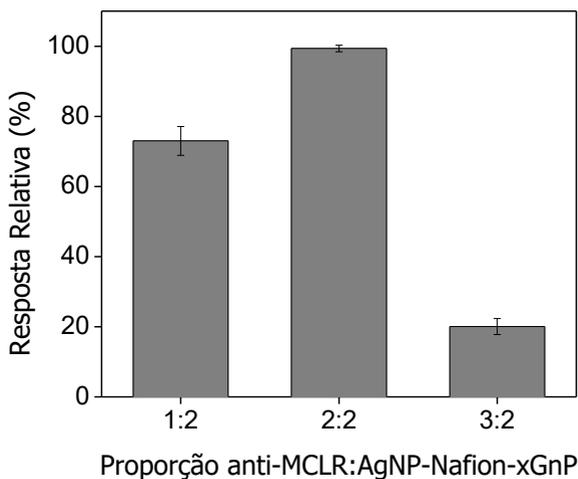
5.6 Otimização da quantidade de anti-MCLR

Para o estudo da quantidade de anti-MCLR a ser aplicada na construção do imunossensor, foram testados diferentes volumes da solução de anti-MCLR na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ misturados à dispersão de AgNP-Nafion-xGnP. Foram testadas as proporções de 1:2, 2:2 e 3:2, respectivamente 10, 20 e 30 μL de solução de anti-MCLR para 20 μL de dispersão de AgNP-Nafion-xGnP, 2 μL de cada mistura AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR foram aplicados à superfície do GCE e, após secagem, foram obtidos os picos base

para cada imunossensor. Após a obtenção destes voltamogramas cada imunossensor foi incubado com 2 μL de solução de MCLR na concentração 1,0 ng mL^{-1} por 30 min, sendo realizada nova medida voltamétrica após este tempo.

A resposta relativa referente a supressão obtida para cada proporção encontra-se na Figura 17.

Figura 17. Estudo da proporção de anti-MCLR:AgNP-Nafion-xGnP a partir da supressão do pico base obtido em solução de PBS (0,01 mol L^{-1} , pH 7,4) para o imunossensor construído com as diferentes dispersões.



A proporção de anti-MCLR:AgNP-Nafion-xGnP escolhida para a construção do imunossensor foi 2:2 uma vez que esta mistura foi a que gerou mais supressão, implicando em uma formação mais efetiva do imunocomplexo.

O aumento de supressão observado na proporção 2:2 em relação à proporção 1:2 pode ser atribuído à presença de mais anticorpos imobilizados e disponíveis para interação com os antígenos.

O decréscimo de supressão observado utilizando a proporção 3:2 se deve possivelmente à quantidade insuficiente de nanomaterial para imobilização dos anticorpos, permitindo que poucas sejam fixadas no imunossensor para interação com o antígeno.

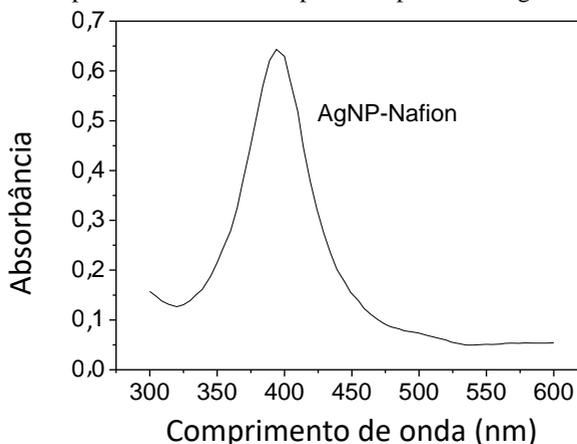
5.7 Caracterização dos nanomateriais

A caracterização dos nanomateriais utilizados na modificação do imunossensor proposto foi realizada através de espectroscopia UV-Vis, FEG-SEM, TEM e potencial zeta.

5.7.1 Espectroscopia UV-Vis

As medidas de espectroscopia UV-Vis realizadas apresentaram uma banda de ressonância plasmônica com máximo de absorvância no comprimento de onda 400 nm, (Figura 18), encontrando-se dentro da faixa característica de absorção para nanopartículas de prata com diâmetro próximo ao obtido para esta síntese (PYATENKO; YAMAGUCHI; SUZUKI, 2007; AGNIHOTRI; MUKHERJI, Soumyo; MUKHERJI, Suparna, 2014).

Figura 18. Espectro UV-Vis obtido para a dispersão de AgNP-Nafion.

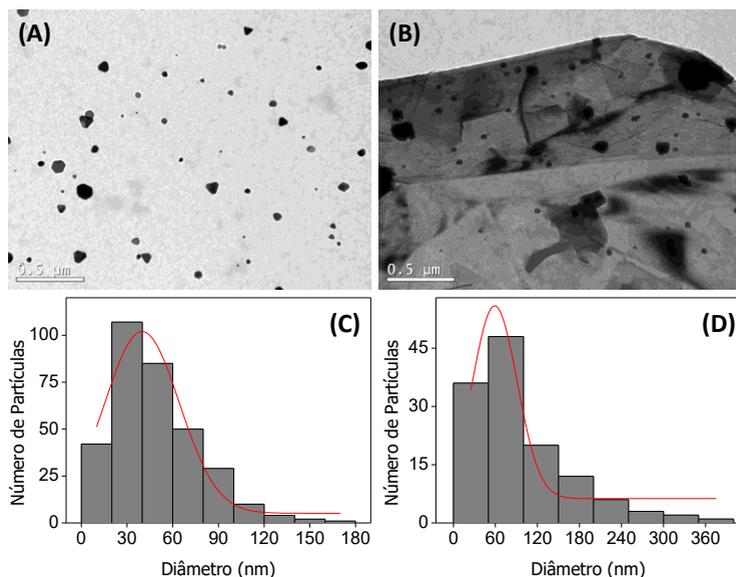


5.7.2 Microscopias TEM e FEG-SEM

Para avaliar os aspectos físicos dos materiais utilizados na modificação do imunossensor foram realizadas microscopias TEM e FEG-SEM. Através das micrografias obtidas é possível observar o formato e nível de dispersão dos nanomateriais. Nas Figuras 19 (A) e 19 (B) são apresentadas as micrografias TEM de AgNP-Nafion e AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR; as Figuras 19 (C) e (D)

apresentam histogramas com a distribuição do número de nanopartículas por diâmetros em cada suspensão obtidos com auxílio do software ImageJ baseado em aproximadamente 300 partículas para AgNP-Nafion e AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR respectivamente.

Figura 19. Imagens obtidas através de TEM para (A) AgNP-Nafion e (B) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR e histogramas com a distribuição de números de partículas por diâmetros para (C) AgNP-Nafion e (D) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR.



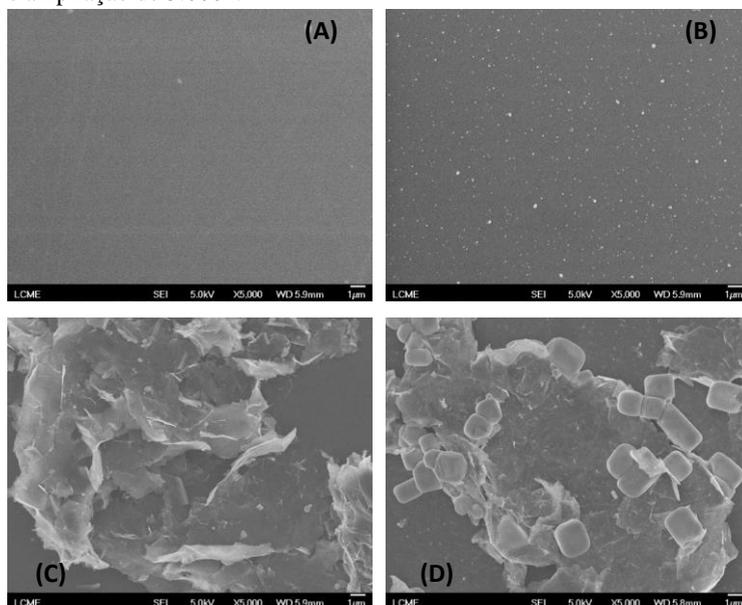
A partir dos histogramas com a distribuição de número de partículas por diâmetro foi possível obter o diâmetro médio para as AgNP-Nafion de $39,8 \pm 2,55$ nm e de $59,07 \pm 4,61$ nm para as AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR. Através das imagens obtidas foi possível identificar que as AgNP encontram-se em geral bem dispersas, sem sinal de agregação o que significa que foi obtido sucesso na estabilização das mesmas em Nafion. Pode-se observar que as AgNP possuem formato majoritariamente esférico e, na Figura 19 (B) encontram-se presas às xGnP, que são as estruturas de aparência enrugada, devido à presença das camadas características deste material. As AgNP-Nafion apresentam uma

ligeira mudança de formato e aumento em seu diâmetro na Figura 19 (B) resultantes da imobilização dos anticorpos.

As imagens apresentadas na Figura 20 foram obtidas através de FEG-SEM sendo possível observar em (A) a superfície limpa do GCE, em (B) AgNP-Nafion/GCE, em (C) AgNP-Nafion-xGnP/GCE e em (D) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE.

A Figura 20 (A) apresenta a superfície limpa e sem modificação do GCE, na Figura 20 (B) as AgNP-Nafion (pontos claros) podem ser observadas bem distribuídas sobre a superfície do GCE, em (C) observa-se principalmente as estruturas lamelares características das xGnP e em (D) é possível confirmar a imobilização dos anticorpos (estruturas de formato quadrado) nas xGnP. Pode-se afirmar que houve um aumento na área superficial ativa em relação ao GCE não modificado, o que contribui para o aumento da sensibilidade analítica do imunossensor.

Figura 20. Micrografias de SEM-FEG para (A) GCE limpo, (B) AgNP-Nafion/GCE, (C) AgNP-Nafion-xGnP/GCE e (D) AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE obtidas utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kV e ampliação de 5.000x.



5.7.3 Medidas de potencial zeta

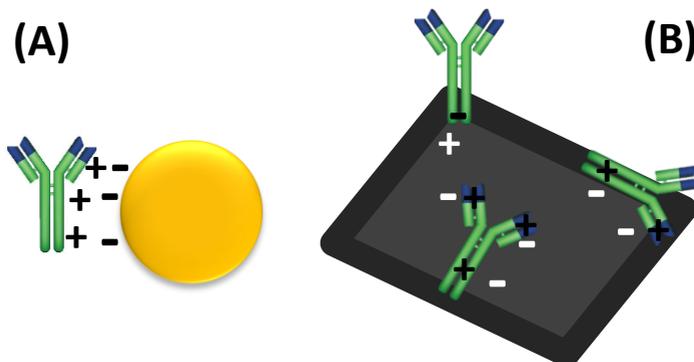
Foram realizadas medidas de potencial zeta para obter informações referentes a estabilidade das dispersões de AgNP-Nafion e estabelecer uma possível interação das nanopartículas com os anticorpos. O potencial zeta reflete o potencial na superfície das nanopartículas que sofre influência dos grupos presentes no meio em que estas se encontram, indicando uma carga superficial que pode ser positiva, negativa ou neutra (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; HAIDER; MEHDI, 2014). Para dispersões com boa estabilidade são obtidos geralmente valores acima de +30 mV ou menores que -30 mV (HAIDER; MEHDI, 2014).

As medidas de potencial zeta realizadas para as AgNP-Nafion obtiveram uma média de $-51,25 \text{ mV} \pm 0,2$, o que implica em uma suspensão estável e uma superfície carregada negativamente devido à presença das moléculas de Nafion, que é um polieletrólito aniônico e apresenta cargas negativas.

Supõe-se portanto que a imobilização dos anticorpos nas AgNP-Nafion ocorre através de interações eletrostáticas entre a carga negativa na superfície das nanopartículas e as cargas positivas presentes na estrutura do anticorpo como sugerido por Jazayeri e colaboradores (2016) e representado na Figura 21 (A).

Além da adsorção dos anticorpos nas AgNP-Nafion pode-se observar através das micrografias obtidas a imobilização dos anticorpos nas xGnP, possivelmente através de interações de van der Waals como reportado por Vilhena e colaboradores (2016) e representado na Figura 21 (B).

Figura 21. Disposições possíveis dos anticorpos imobilizados em (A) AgNP-Nafion e (B) xGnP.

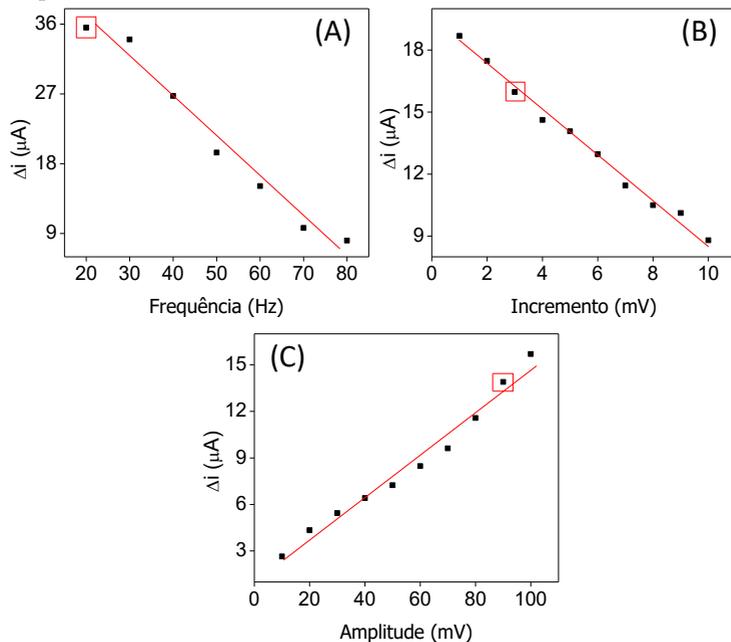


Fonte: Própria (2018).

5.8 Otimização dos parâmetros da VOQ

A VOQ é aplicada com base em alguns parâmetros que podem ser variados de forma que forneçam maior sensibilidade ao imunossensor, estes parâmetros são chamados frequência, associada à velocidade de aplicação dos pulsos de potencial; incremento, referente à distância entre os pontos ao longo do eixo de potencial e amplitude que está relacionada à resolução do voltamograma. Para o presente estudo foram avaliados estes parâmetros nas faixas: frequência (20–80 Hz), incremento de potencial (1–10 mV) e amplitude de pulso (10–100 mV) utilizando o imunossensor construído e obtendo os resultados demonstrados na Figura 22.

Figura 22. Otimização dos parâmetros da VOQ: (A) frequência (faixa de estudo: 20 –80 Hz) com incremento de 5 mV e amplitude de 50 mV; (B) incremento (faixa de estudo: 1 –10 mV) com frequência de 20 Hz e amplitude de 50 mV; (C) amplitude (faixa de estudo: 10 –100 mV) com frequência de 20 Hz e incremento de 3 mV.



Os valores escolhidos para cada parâmetro otimizado foram aqueles que proporcionaram os maiores valores de corrente sem causar distorções nos picos obtidos, sendo os pontos destacados na Figura 22 os escolhidos, 20 Hz para frequência, 3 mV para incremento de potencial e 90 mV para amplitude. Estes valores foram aplicados nos estudos subsequentes.

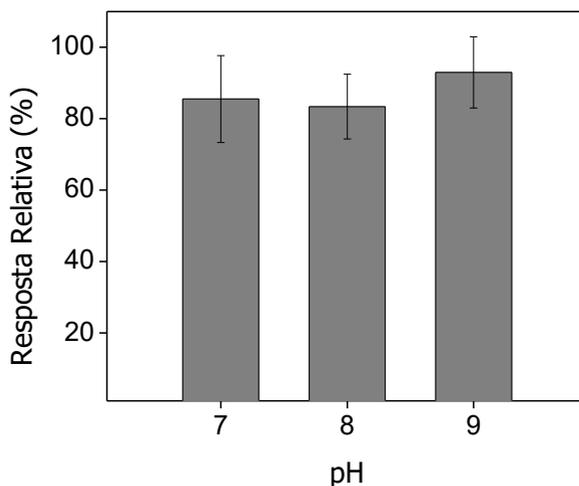
5.9 Estudo do pH do eletrólito suporte

O eletrólito suporte é um eletrólito eletroquimicamente inerte na faixa de potencial aplicada. Ele é adicionado em excesso à célula eletroquímica com o objetivo de fornecer propriedades resultantes da manutenção da força iônica alta e constante à solução, resultando em uma simplificação do estudo da interface eletrodo-solução (AGOSTINHO *et al.*, 2004).

O pH do eletrólito suporte, PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foi estudado na faixa de 7,0 a 9,0 para que fosse avaliada a influência deste parâmetro na resposta do imunossensor.

O gráfico de barras abaixo (Figura 23) mostra a resposta de corrente obtida utilizando o imunossensor proposto nos pHs 7,0; 8,0 e 9,0.

Figura 23. Respostas de corrente obtidas para o imunossensor proposto em solução de PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 7, 8 e 9.



As respostas de corrente obtidas para o imunossensor proposto utilizando o eletrólito de suporte nos pHs testados não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$ para teste *t*). A ausência de variação da resposta de corrente em diferentes pHs indica a robustez do imunossensor desenvolvido, possibilitando seu uso na faixa de pH de 7 a 9.

A faixa avaliada é compatível com valores obtidos para o pH da água do mar que encontra-se em torno de 8,1 sugerindo a possibilidade de utilização do imunossensor para análises neste tipo de amostra (MILLERO, 2007).

Os resultados obtidos aproximam-se dos observados por Talamini e colaboradores (2018) que obtiveram melhores respostas de corrente em pH alcalino na aplicação de um imunossensor para MCLR.

No entanto, a maioria dos imunossensores reportados na literatura para MCLR apresenta respostas ótimas próximo ao pH

neutro (RUIYI *et al.*, 2013; GAN *et al.*, 2016; ZHANG, Y. *et al.*, 2017; PANG *et al.*, 2018).

Por outro lado, os pesquisadores Karimi, Kirk e Andreescu (2017) em um estudo sobre a dependência do pH na oxidação de AgNPs observaram aumento da resposta de corrente com o aumento do pH do eletrólito suporte. Ensafi e colaboradores (2016) constataram resultados ótimos em pH alcalino para um sensor eletroquímico modificado com AgNPs.

De acordo com os estudos apresentados é possível atribuir o comportamento observado neste trabalho a uma característica das AgNPs que são a sonda eletroquímica utilizada. O pH 9,0 foi então utilizado para os estudos subsequentes.

5.10 Estudo do tempo de incubação

O tempo de incubação do antígeno foi estudado com o objetivo de avaliar o tempo necessário para que ocorra a ligação efetiva entre antígeno e anticorpo.

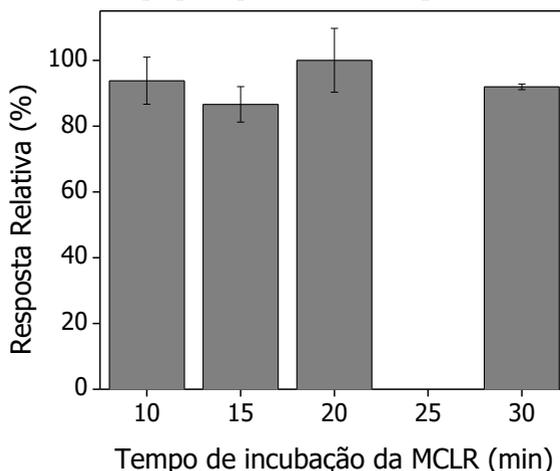
Em geral, os trabalhos apresentando imunossensores para MCLR recentemente publicados possuem tempos de incubação variando de 15 a 90 minutos (HOU *et al.*, 2016; ZHANG Y. *et al.*, 2017; PANG *et al.*, 2018; TALAMINI *et al.*, 2018).

Para a escolha do melhor tempo de incubação foram realizadas análises após 10, 15, 20 e 30 min de incubação com 2 μL de solução de MCLR na concentração $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ sobre o imunossensor.

As supressões de corrente obtidas para os quatro tempos não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$ para teste t), indicando que o tempo de incubação do antígeno não afeta significativamente a formação de imunocomplexos para este imunossensor.

No tempo de 10 minutos já foi possível observar o valor máximo de supressão obtido, o que levou à escolha deste tempo como tempo de incubação do antígeno. Os dados deste estudo encontram-se na Figura 24.

Figura 24. Resposta relativa das supressões de corrente obtidas após incubação com 2 μL de solução de MCLR na concentração 1,0 ng mL^{-1} sobre o imunossensor proposto por diferentes tempos.



5.11 Curva de calibração

Foi construída uma curva de calibração externa com o objetivo de obter uma relação linear entre a supressão de corrente e a concentração de MCLR em solução. Para isto foram utilizadas soluções padrão de MCLR em concentrações de 0,50–5000 ng mL^{-1} aplicadas sobre o imunossensor sob condições otimizadas. Para a medida de corrente de cada concentração foi construído um novo imunossensor. A curva de calibração foi obtida através da relação entre o logaritmo da concentração de MCLR e a supressão da corrente.

Os voltamogramas obtidos em PBS (0,01 mol L^{-1} pH 9,0) encontram-se na Figura 25, onde 'a' representa o pico base (0,0 ng mL^{-1} MCLR) e 'b a f' representam as concentrações 0,50; 5,0; 50,0; 500 e 5000 ng mL^{-1} e na Figura 26 encontra-se a curva de calibração para MCLR.

Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada em PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0) onde 'a' representa o pico base ($0,0 \text{ ng mL}^{-1}$ MCLR) e 'b a f' representam as concentrações 0,50; 5,0; 50,0; 500 e 5000 ng mL^{-1} .

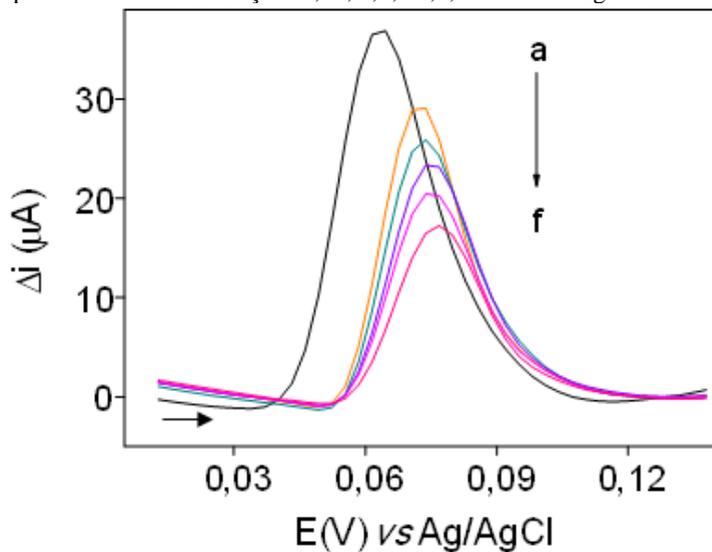
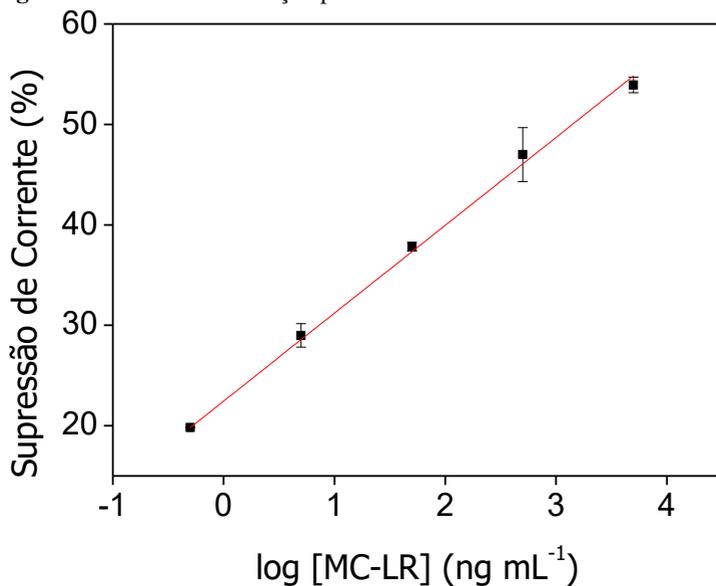


Figura 26. Curva de calibração para MCLR.



A curva de calibração obtida possui equação da reta $SC = 22,46 (\pm 0,05) + 8,75 (\pm 0,14) \log [MCLR]$ demonstrando uma boa relação linear entre a porcentagem de supressão da corrente (SC) e o logaritmo das concentrações de MCLR de 0,50 a 5000 ng mL⁻¹ com um fator de correlação entre os pontos (r^2) de 0,998 que está de acordo com as recomendações da ANVISA ($r^2 = 0,99$) e do INMETRO ($r^2 > 0,90$) (RIBANI *et al.* 2004).

O limite de detecção (LOD) foi calculado através da Equação (1) utilizando os parâmetros fornecidos pela curva de calibração, utilizando “3” como fator numérico para o nível de confiança de 98 % onde “ σ ” representa o desvio do intercepto e “s” representa o valor da inclinação da curva de calibração (RIBANI *et al.* 2004; SKOOG, 2006).

$$LOD = 3 \frac{\sigma}{s} \quad (1)$$

A partir dos parâmetros da equação da reta foi possível ainda calcular o limite de quantificação (LOQ) através da equação (2) onde novamente “ σ ” representa o desvio do intercepto e “s” representa o valor da inclinação da curva de calibração (RIBANI *et al.*, 2004).

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{s} \quad (2)$$

Os valores de LOD e LOQ obtidos foram de 0,017 ng mL⁻¹ e 0,057 ng mL⁻¹, respectivamente, indicando alta sensibilidade para aplicação em amostras aquáticas.

A Tabela 1 mostra a comparação da faixa linear, limite de quantificação e o tempo de incubação de alguns imunossensores reportados na literatura. É possível perceber que o imunossensor desenvolvido possui LOD inferior a maioria dos artigos publicados além de relatar o menor tempo de incubação, o que proporciona obtenção rápida de um resultado de análise. Ressalta-se também a aplicação em uma faixa ampla e compatível com os outros trabalhos. Estas características indicam a relevância do trabalho desenvolvido.

Tabela 1. Comparação do imunossensor desenvolvido com imunossensores descritos na literatura.

2.3.3 Sensor	Faixa de aplicação	LOD	Tempo de incubação (min)	Referência
anti-MCLR/ AuNCs/MoS ₂ /Au	1,0 ng L ⁻¹ – 1,0 mg L ⁻¹	0,3 ng L ⁻¹	90	PANG <i>et al.</i> , 2018
anti-MCLR/ AuNP- BSA/ Br-Py/GCE	0,05 – 500 ng mL ⁻¹	0,05 ng mL ⁻¹	15	TALAMINI <i>et al.</i> , 2018
anti-MCLR/ AuNRs/MoS ₂ /Au	0,01 – 20 µg L ⁻¹	5,0 ng L ⁻¹	60	ZHANG Y. <i>et al.</i> , 2017
Ab ₂ -AuNP/PPyMS/ ab-MCLR/MCLR/ PEG/CNT/GCE	0,25 ng L ⁻¹ – 50 µg L ⁻¹	0,1 ng L ⁻¹	60	ZHANG; XIONG; CHEN, 2017
multi-HRP-(MCSs/ Thi@AuNPs)-Ab ₂ / AuNPs/GH@PDA/ SPCE	0,01 - 10 µg L ⁻¹	0,0097 µg L ⁻¹	60	GAN <i>et al.</i> , 2016
MCLR-BSA/ AuNPs/GCE	0,01 – 100 µg L ⁻¹	0,004 µg L ⁻¹	40	HOU <i>et al.</i> , 2016
Au/anti-MCLR/ MCLR/PEG/CNFs/ GCE	0,0025 – 5,0 ng mL ⁻¹	0,0017 ng mL ⁻¹	60	ZHANG J. <i>et al.</i> , 2016
Ag@MSN-BSA- MCLR/GCE	0,5 – 30 ng mL ⁻¹	0,2 ng mL ⁻¹	75	ZHAO <i>et al.</i> , 2016
Este trabalho	0,50 - 5000 ng mL ⁻¹	0,017 ng mL ⁻¹	10	-

AuNCs: nanoclusters de ouro; MoS₂: dissulfeto de molibdênio; AuNP-BSA: nanopartículas de ouro estabilizadas em BSA; Br-Py: (E)-1-decyl-4-[(4-decyloxyphenyl)diazenyl]pyridinium bromide; AuNRs: nanorods de ouro; Ab₂-AuNP/PPyMS: anticorpos marcados com nanopartículas de ouro imobilizadas em microesferas de polipirrol; PEG: polietilenoglicol; HRP: horseradish peroxidase; Thi: tionina; GH@PDA: hidrogel de polidopamina em grafeno; SPCE: eletrodo mpresso de carbono; MSN: sílica mesoporosa; CNF: nanofibras de carbono.

5.12 Estudo de possíveis interferentes

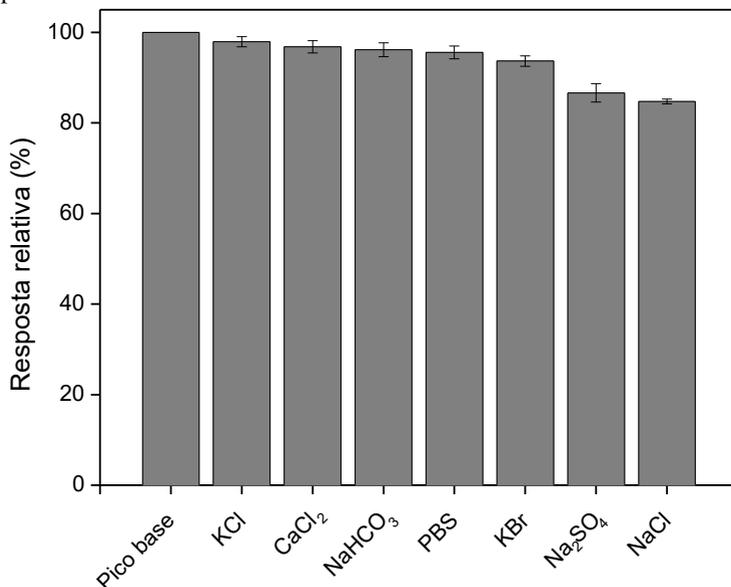
Segundo reportado na literatura por Millero e colaboradores (2008); La Cruz, Lynch e Dionysiou (2012) e Talamini e colaboradores (2018), em água do mar estão presentes vários sais capazes de gerar interferência na análise de MCLR por

imunossensores, dentre eles KCl, KBr, NaCl, Na₂SO₄, NaHCO₃ e CaCl₂. Portanto, estas substâncias foram avaliadas como possíveis interferentes na resposta do imunossensor.

As medidas de corrente na presença dos possíveis interferentes foram realizadas após incubação por 10 minutos com cada substância. Foi incluída ainda a solução de PBS como interferente, para verificar se a incubação apenas do eletrólito suporte/diluyente do antígeno seria capaz de gerar uma resposta.

A Figura 27 demonstra as respostas relativas obtidas para cada um dos possíveis interferentes testados.

Figura 27. Resposta relativa do imunossensor proposto na presença dos possíveis interferentes.



Em relação ao pico base, a maioria dos componentes apresentaram inibição abaixo de 7 %: KCl ($2,07 \pm 1,09\%$), CaCl₂ ($3,20 \pm 1,35\%$), NaHCO₃ ($3,84 \pm 1,51\%$), PBS ($4,43 \pm 1,35\%$), e KBr ($6,32 \pm 1,15\%$) acarretando em uma interferência muito baixa.

Os componentes que apresentaram maior interferência na resposta do imunossensor foram NaCl e Na₂SO₄, obtendo inibição de $15,26 \pm 1,42$ e $13,38 \pm 2,03$ %, respectivamente. Considera-se ainda um nível de resposta relativamente baixo, incapaz de gerar interferência nas análises realizadas em água do mar em geral, pois

a concentração mínima que pode ser quantificada utilizando este imunossensor apresenta supressão de corrente de mais de 19%, superior à maior interferência apresentada.

Em águas com níveis muito elevados de NaCl (concentração maior que $0,4 \text{ mol L}^{-1}$) e Na_2SO_4 (concentração maior que $0,03 \text{ mol L}^{-1}$) existe a possibilidade da geração de falsos positivos, o que pode ser contornado com um pré-tratamento da amostra.

5.13 Estudo da estabilidade e repetibilidade inter-dia e intra-dia

Para avaliar a estabilidade do imunossensor proposto e possibilidade de reutilização, após sua construção sob as condições otimizadas foi realizada a análise de uma solução padrão de MCLR $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$. Em seguida, foi lavado com PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0) e armazenado em geladeira a aproximadamente 4°C por sete dias. Decorrido este tempo a mesma análise foi realizada, a partir de uma nova medida de pico base e da solução padrão. Obteve-se uma resposta de 94,3 %, ou seja, havendo perda de apenas 5,7 % de resposta em relação a resposta inicial para a mesma concentração, indicando alta estabilidade e possibilidade de reutilização para este imunossensor.

O estudo da repetibilidade intra-dia foi realizado em um mesmo dia através da construção de cinco imunossensores e análise de uma solução padrão de MCLR $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$. A resposta obtida para os imunossensores obteve desvio padrão relativo (RSD) de 14,1 %. Para o estudo da repetibilidade inter-dia o imunossensor foi construído sobre o mesmo eletrodo em sete diferentes dias e realizada a análise de uma solução padrão de MCLR $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ obtendo RSD de 7,0 %, estes resultados indicam repetibilidade razoável na construção e resposta do imunossensor se tratando de concentrações em níveis de ppb (RIBANI *et al.*, 2004).

5.14 Determinação em amostra

Para a avaliação de seu funcionamento em amostra real, o imunossensor AgNP-Nafion-xGnP-anti-MCLR/GCE foi aplicado na determinação de MCLR em água do mar coletada na Praia de Jurerê, Florianópolis – SC, cujo pH detectado foi de 7,17. A análise

desta amostra não gerou supressão do pico base indicando ausência de MCLR. Para simular uma amostra contaminada a amostra obtida foi fortificada com MCLR $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ e incubada sobre o imunossensor por 10 min.

A análise da amostra fortificada foi realizada em triplicata detectando uma concentração média de $1,06 \pm 0,06 \text{ ng mL}^{-1}$ através de regressão linear utilizando a equação da reta da curva de calibração externa obtida previamente. O erro relativo para as medidas realizadas foi de 5,8 %, com porcentagem de recuperação de 105,8 % e RSD de 4,4 % sendo bastante adequado para a análise em uma amostra complexa.

6 CONCLUSÃO

O imunossensor *label-free* desenvolvido neste trabalho de pesquisa a partir da construção em uma etapa, gerou um dispositivo capaz de detectar MCLR em amostra de água do mar que após otimização apresentou resultados satisfatórios em curto tempo de incubação.

Os estudos aplicando AgNPs e xGnPs demonstraram a possibilidade da utilização do pico de oxidação da prata presente nas nanopartículas como sonda redox do imunoenensaio tendo sua resposta ampliada pela presença das xGnPs.

Foi possível sintetizar e escolher as nanopartículas e a técnica mais adequadas para aplicação no imunossensor, assim como estudar as quantidades de anticorpos e xGnPs a serem utilizadas, otimizar os parâmetros da técnica voltamétrica e o pH do eletrólito de suporte.

O estudo da contribuição dos modificadores através de VOQ e EIS e a utilização das técnicas de microscopia foram fundamentais para o estudo do funcionamento do imunossensor indicando que a presença do nanomaterial é de extrema importância para o ancoramento dos anticorpos e consequentemente para o funcionamento do imunoenensaio.

O conjunto de estudos realizados resultou em um método estável com boa repetibilidade inter e intra-dia além de baixa interferência externa devido a presença dos anticorpos para MCLR que interagem de maneira específica com o antígeno.

Ademais se pode afirmar que foi possível determinar com sucesso MCLR em água do mar fortificada e o imunossensor desenvolvido foi capaz de trabalhar em uma ampla faixa de concentrações indicando a possibilidade futura de aplicação do mesmo em amostras de outras fontes com variadas concentrações de MCLR. Outra perspectiva futura é a miniaturização do sistema para permitir sua portabilidade.

O imunossensor desenvolvido possui alta resposta de corrente utilizando baixa quantidade de reagentes implicando em um método de detecção sensível e de baixo custo além de causar baixo impacto ao meio ambiente e promover o avanço da pesquisa no segmento da aplicação de nanomateriais em sensores eletroquímicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; AGOSTINHO NETO, A.; ARANHA, H. O. Eletrolito Suporte e suas Múltiplas Funções em Processos de Eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813–817, 2004.

ALWARAPPAN, S.; ERDEM, A.; LIU, C.; LI, C. Z. Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 20, p. 8853–8857, 2009.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. **Toxicology**, v. 181–182, p. 441–446, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria No. 1469 de 29 de dezembro de 2000.

BRONDANI, D.; SOUZA, B. DE; S. SOUZA, B.; NEVES, A.; C. VIEIRA, I. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: A new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, n. 1, p. 242–247, 2013.

BRONDANI, D.; ZAPP, E.; HEYING, R. DA S.; SOUZA, B. DE; VIEIRA, I. C. Copper-based Metal-organic Framework Applied in the Development of an Electrochemical Biomimetic Sensor for Catechol Determination. **Electroanalysis**, v. 29, n. 12, p. 2810–2817, 2017.

BRUGNEROTTO, P.; SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Gold Nanoparticles Stabilized in β -Cyclodextrin and Decorated with Laccase Applied in the Construction of a Biosensor for Rutin. **Electroanalysis**, v. 29, n. 4, p. 1031–1037, 2017.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: An updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 241–259, 2010.

CARMICHAEL, W. W. The cyanotoxins. In: CALLOW, J. A. **Advances in Botanical Research**. [S.l]: Academic Press, v. 27, p. 211–256, 1997.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S. M. F. O.; AN, J. S.; MOLICA, R. J. R.; JOCHIMSEN, E. M.; LAU, S.; RINEHART, K. L.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human fatalities form cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663–668, 2001.

CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

CHEN, L.; CHEN, J.; ZHANG, X.; XIE, P. A review of reproductive toxicity of microcystins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 381–399, 2016.

CHUNG, D. D. L. A review of exfoliated graphite. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 1, p. 554–568, 2015.

DELGADO, K. P.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; CAMPOS, A. M.; OLIVEIRA, O. N.; JANEGITZ, B. C. Ultralow Cost Electrochemical Sensor made of Potato Starch and Carbon Black Nanoballs to Detect Tetracycline in Waters and Milk. **Electroanalysis**, v. 30, p. 2153–2159, 2018.

ELGRISHI, N.; ROUNTREE, K. J.; MCCARTHY, B. D.; ROUNTREE, E. S.; EISENHART, T. T.; DEMPSEY, J. L. A

Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

ENSAFI, A. A.; ZANDI-ATASHBAR, N.; REZAEI, B.; GHIACI, M.; CHERMAHINI, M. E.; MOSHIRI, P. Non-enzymatic glucose electrochemical sensor based on silver nanoparticle decorated organic functionalized multiwall carbon nanotubes. **RSC Advances**, v. 6, n. 65, p. 60926–60932, 2016.

EVTUGYN, G.; HIANIK, T. Electroanalytical Bioplatfoms Based on Carbon Nanostructures as New Tools for Diagnosis. In: NIKOLELIS, D. P.; NIKOLELI G. P. **Nanotechnology and Biosensors**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2018. cap 9, p. 269-306.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 470–478, 2018.

FERNANDES, K. H. A. A.; SANTOS, J. P. T. D. S.; COLLE, V. DEL; SOUZA-GARCIA, J.; ANGELUCCI, C. A. Considerações técnicas quanto ao uso da voltametria de varredura escalonada em processos adsortivos. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 431–435, 2015.

FRANCY, D. S.; BRADY, A. M. G.; ECKER, C. D.; GRAHAM, J. L.; STELZER, E. A.; STRUFFOLINO, P.; DWYER, D. F.; LOFTIN, K. A. Estimating microcystin levels at recreational sites in western Lake Erie and Ohio. **Harmful Algae**, v. 58, p. 23–34, 2016.

FRITZ, G.; SCHÄDLER, V.; WILLENBACHER, N.; WAGNER, N. J. Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. **Langmuir**, v. 18, p. 6381–6390, 2002.

GAN, C.; SUN, Z.; LING, L.; HE, Z.; LEI, H.; LIU, Y. Construction of portable electrochemical immunosensors based on graphene hydrogel@polydopamine for microcystin-LR detection using multi-mesoporous carbon sphere-enzyme labels. **RSC Advances**, v. 6, p. 51662–51669, 2016.

GURBUZ, F.; UZUNMEHMETOĞLU, O. Y.; DILER, Ö.; METCALF, J. S.; CODD, G. A. Occurrence of microcystins in

water, bloom, sediment and fish from a public water supply. **Science of the Total Environment**, v. 562, p. 860–868, 2016.

HAIDER, M. J.; MEHDI, M. S. Study of morphology and Zeta Potential analyzer for the Silver Nanoparticles. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 5, n. 7, p. 381–387, 2014.

HOU, L.; DING, Y.; ZHANG, L.; GUO, Y.; LI, M.; CHEN, Z.; WU, X. An ultrasensitive competitive immunosensor for impedimetric detection of microcystin-LR via antibody-conjugated enzymatic biocatalytic precipitation. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 233, p. 63–70, 2016.

ION, A. C.; ION, I.; CULETU, A.; GHERASE, D.; MOLDOVAN, C. A.; IOSUB, R.; DINESCU, A. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructure-chitosan composite material for organophosphate pesticides. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 6, p. 817–821, 2010.

ION, I.; ION, A. C.; CULETU, A. Application of an exfoliated graphite nanoplatelet-modified electrode for the determination of quintozen. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 7, p. 1553–1557, 2011.

JAZAYERI, M. H.; AMANI, H.; POURFATOLLAH, A. A.; PAZOKI-TOROUDI, H.; SEDIGHIMOOGHADDAM, B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 9, p. 17–22, 2016.

KARIMI, A.; KIRK, K. A.; ANDREESCU, S. Electrochemical Investigation of pH-Dependent Activity of Polyethylenimine-Capped Silver Nanoparticles. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 11, p. 2801–2806, 2017.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODRONIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 88–105, 2016.

KRAYNOV, A.; MÜLLER, T. Concepts for the Stabilization of Metal Nanoparticles in Ionic Liquids. In: HANDY, S. (Ed.). **Applications of Ionic Liquids in Science and Technology**. [s.l]: InTech, 2011. cap. 12 p. 235–260.

LA CRUZ, A. A. DE; LYNCH, T. J.; DIONYSIOU, D. D. The Effects of Sample Matrices on Immunoassays to Detect Microcystin-LR in Water. **Journal of Environmental Protection**, v. 03, n. 10, p. 1275–1285, 2012.

LASIA, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. In: CONWAT, B. E.; BOCKRIS, J. O'M; WHITE, R.E. **Modern Aspects of Electrochemistry**. [s.l]: Kluwer Academic Publishers, 2002. cap. 2, p. 143-248.

LIN, J.; JU, H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 8, p. 1461–1470, 2005.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: Considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318–1325, 2006.

LU, J.; DRZAL, L. T.; WORDEN, R. M.; LEE, I. Simple fabrication of a highly sensitive glucose biosensor using enzymes immobilized in exfoliated graphite nanoplatelets nafion membrane. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 25, p. 6240–6246, 2007.

LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1–2, p. 1–26, 2001.

MASH, H.; WITTKORN, A. Effect of chlorination on the protein phosphatase inhibition activity for several microcystins. **Water Research**, v. 95, p. 230–239, 2016.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 237–256, 2002.

MELO, M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MERKOÇI, A. Nanoparticles Based Electroanalysis in Diagnostics Applications. **Electroanalysis**, v. 25, n. 1, p. 15–27, 2013.

ReMILLERO, F. J. The Marine Inorganic Carbon Cycle. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 2, p. 308–341, 2007.

MILLERO, F. J.; FEISTEL, R.; WRIGHT, D. G.; MCDOUGALL, T. J. The composition of Standard Seawater and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale. **Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 55, n. 1, p. 50–72, 2008.

MODY, V. V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H. R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282, 2010.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K. DE; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PALINSKA, K. A.; SUROSZ, W. Taxonomy of cyanobacteria: A contribution to consensus approach. **Hydrobiologia**, v. 740, n. 1, p. 1–11, 2014.

PANG, P.; TENG, X.; CHEN, M.; ZHANG, Y.; WANG, H.; YANG, C.; YANG, W.; BARROW, C. J. Ultrasensitive enzyme-free electrochemical immunosensor for microcystin-LR using molybdenum disulfide/gold nanoclusters nanocomposites as platform and Au@Pt core-shell nanoparticles as signal enhancer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 266, p. 400–407, 2018.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para

aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012–1021, 2002.

POURIA, S.; ANDRADE, A. DE; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v. 352, n. 9121, p. 21–26, 1998.

PYATENKO, A.; YAMAGUCHI, M.; SUZUKI, M. Synthesis of spherical silver nanoparticles with controllable sizes in aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 22, p. 7910–7917, 2007.

REDUAN, N. A.; GHAZALI, S.; JAMARI, S. S. Effect of Temperature and NaCl Concentration on Synthesis of Silver Nanoparticles Prepared in Aqueous Medium. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 11, n. 10, p. 6399–6404, 2016.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RICCARDI, C. D. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.

ROGERS, K. R. Principles of Affinity-Based Biosensors. **Molecular Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 109–130, 2000.

RÓZ, A. L. DA; FERREIRA, M.; LEITE, F. D. L.; OLIVEIRA, O. N. DE. **Nanoscience and its Applications**. 1. ed. Oxford: William Andrew, 2017

RUIYI, L.; QIANFANG, X.; ZAIJUN, L.; XIULAN, S.; JUNKANG, L. Electrochemical immunosensor for ultrasensitive

detection of microcystin-LR based on graphene–gold nanocomposite/functional conducting polymer/gold nanoparticle/ionic liquid composite film with electrodeposition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 235–240, 2013.

SANDIFER, J. Electroanalytical Techniques. In: OTHMER, D.; KIRK, R.E. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. [s.l]: John Wiley & Sons, Inc., 2004. Vol. 9, 5 ed., p. 567- 590.

SANTANA, E. R.; LIMA, C. A. DE; PIOVESAN, J. V.; SPINELLI, A. An original ferroferric oxide and gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode for the determination of bisphenol A. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 240, p. 487–496, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; LUCCA FREITAS, L. DE; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SHANG, N. G.; PAKONSTANTINO, P.; MCMULLAN, M.; CHU, M.; STAMBOULIS, A.; POTENZA, A.; DHESI, S. S.; MARCHETTO, H. Catalyst-free efficient growth, orientation and biosensing properties of multilayer graphene nanoflake films with sharp edge planes. **Advanced Functional Materials**, v. 18, n. 21, p. 3506–3514, 2008.

SILVA, B. V. M.; CAVALCANTI, I. T.; SILVA, M. M. S.; DUTRA, R. F. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, v. 117, p. 431–437, 2013.

SILVA, T. R.; SMANIOTTO, A.; VIEIRA, I. C. Exfoliated graphite nanoplatelets and gold nanoparticles based electrochemical sensor for determination of levodopa. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 5, p. 1277–1287, 2017.

SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly (allylamine hydrochloride) and

decorated with laccase for determination of dopamine. **Analyst**, v. 141, n. 1, p. 216–224, 2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R., Fundamentos de Química Analítica. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SMANIOTTO, A.; MEZALIRA, D. Z.; ZAPP, E.; GALLARDO, H.; VIEIRA, I. C. Electrochemical immunosensor based on an azo compound for thyroid-stimulating hormone detection. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 510–517, 2017.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, 2004.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Review Electrochemical Sensors : A Powerful Tool in Analytical Chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159–173, 2003.

TALAMINI, L.; ZANATO, N.; ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C. Direct Electrochemical Nano-immunosensor for Microcystin-LR in Seawater. **Electroanalysis**, v. 30, n. 5, p. 819–827, 2018.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems Fact Sheet**. EPA-810F11001, 2014. Disponível em: <<https://www.epa.gov/nutrient-policy->

data/cyanobacteria-and-cyanotoxins-information-drinking-water-systems-fact-sheet>. Acesso em: 16 fev. 2018.

VADDIRAJU, S.; TOMAZOS, I.; BURGESS, D. J.; JAIN, F. C.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F. Emerging synergy between nanotechnology and implantable biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 7, p. 1553–1565, 2010.

VIEIRA, J. M. D. S.; AZEVEDO, M. T. D. P.; OLIVEIRA AZEVEDO, S. M. F. DE; HONDA, R. Y.; CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 901–909, 2005.

VILHENA, J. G.; DUMITRU, A. C.; HERRUZO, E. T.; MENDIETA-MORENO, J. I.; GARCIA, R.; SERENA, P. A.; PÉREZ, R. Adsorption orientations and immunological recognition of antibodies on graphene. **Nanoscale**, v. 8, n. 27, p. 13463–13475, 2016.

WAN, Y.; SU, Y.; ZHU, X.; LIU, G.; FAN, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 1–11, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. 2 ed. Geneva: World Health Organization, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum**. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 2017.

XING, S.; XU, H.; CHEN, J.; SHI, G.; JIN, L. Nafion stabilized silver nanoparticles modified electrode and its application to Cr(VI) detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 652, n. 1–2, p. 60–65, 2011.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, v. 48, n. 6, p. 627–640, 2006.

ZANATO, N.; TALAMINI, L.; ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C. Label-free Electrochemical Immunosensor for Cardiac Troponin T Based on Exfoliated Graphite Nanoplatelets Decorated with Gold Nanoparticles. **Electroanalysis**, v. 29, n. 7, p. 1820–1827, 2017.

ZAPP, E.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; SOUZA, B. DE; CRUZ VIEIRA, I. Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 127–133, 2014.

ZAPP, E., **Desenvolvimento de Imunossensores à Base de Cristais Líquidos e Nanopartículas de Ouro para Detecção de Biomarcadores Cardíacos**. 2014. 124 p. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ŽEGURA, B.; ŠTRASER, A.; FILIPIČ, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 727, n. 1–2, p. 16–41, 2011.

ZHANG, D.; XIE, P.; LIU, Y.; QIU, T. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 7, p. 2191–2199, 2009.

ZHANG, J.; LEI, J.; XU, C.; DING, L.; JU, H. Immunosensor for Rapid Detection of Microcystin-LR. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 3, p. 1117–1122, 2010.

ZHANG, J.; SUN, Y.; DONG, H.; ZHANG, X.; WANG, W.; CHEN, Z. An electrochemical non-enzymatic immunosensor for ultrasensitive detection of microcystin-LR using carbon nanofibers as the matrix. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 233, p. 624–632, 2016.

ZHANG, J.; XIONG, Z.; CHEN, Z. Ultrasensitive electrochemical microcystin-LR immunosensor using gold nanoparticle functional polypyrrole microsphere catalyzed silver

deposition for signal amplification. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 246, p. 623–630, 2017.

ZHANG, W.; HAN, C.; JIA, B.; SAINT, C.; NADAGOUDA, M.; FALARAS, P.; SYGELLOU, L.; VOGIAZI, V.; DIONYSIOU, D. D. A 3D graphene-based biosensor as an early microcystin-LR screening tool in sources of drinking water supply. **Electrochimica Acta**, v. 236, p. 319–327, 2017.

ZHANG, Y.; LI, J.; WANG, Z.; MA, H.; WU, D.; CHENG, Q.; WEI, Q. Label-free electrochemical immunosensor based on enhanced signal amplification between Au@Pd and CoFe₂O₄/graphene nanohybrid. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–8, 2016.

ZHANG, Y.; CHEN, M.; LI, H.; YAN, F.; PANG, P.; WANG, H.; WU, Z.; YANG, W. A molybdenum disulfide/gold nanorod composite-based electrochemical immunosensor for sensitive and quantitative detection of microcystin-LR in environmental samples. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 244, p. 606–615, 2017.

ZHANG, Z.; ZHANG, X. X.; WU, B.; YIN, J.; YU, Y.; YANG, L. Comprehensive insights into microcystin-LR effects on hepatic lipid metabolism using cross-omics technologies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 315, p. 126–134, 2016.

ZHAO, C.; HU, R.; LIU, T.; LIU, Y.; BAI, R.; ZHANG, K.; YANG, Y. A non-enzymatic electrochemical immunosensor for microcystin-LR rapid detection based on Ag@MSN nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 490, p. 336–342, 2016.