

**PAULO ALEXANDRE ALVES DE ALMEIDA NEVES**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE TRANSISTOR DE  
EFEITO DE CAMPO BASEADO EM GRAFENO PARA DETECTAR  
AFLATOXINA B<sub>1</sub>**

**Belo Horizonte,  
Minas Gerais - Brasil  
2019**

**PAULO ALEXANDRE ALVES DE ALMEIDA NEVES**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE TRANSISTOR DE  
EFEITO DE CAMPO BASEADO EM GRAFENO PARA DETECTAR  
AFLATOXINA B<sub>1</sub>**

Tese submetida Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão  
Co-orientadora: Profa. Dra. Eliane Novato Silva  
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Gribel Lacerda

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2019**

043      Neves, Paulo Alexandre Alves de Almeida.  
Desenvolvimento de um biossensor de transistor de efeito de campo baseado em grafeno para detectar aflatoxina b<sub>1</sub> [manuscrito] / Paulo Alexandre Alves de Almeida Neves. – 2019.  
106 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão. Co-orientadora: Profa. Dra. Eliane Novato Silva. Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Gribel Lacerda.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica. 2. Aflatoxina B<sub>1</sub>. 3. Grafeno. 4. Técnicas Biossensoriais. I. Beirão, Paulo Sérgio Lacerda. II. Silva, Eliane Novato. III. Lacerda, Rodrigo Gribel. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE PAULO ALEXANDRE ALVES DE ALMEIDA NEVES.** Aos quatro dias do mês de outubro de 2019 às 14:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Desenvolvimento de um biossensor de transistor de efeito de campo baseado em grafeno para detectar aflatoxina B1"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Ary Correa Júnior (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Cecília de Carvalho Castro e Silva (Universidade Presbiteriana Mackenzie-SP), aprovado; Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine (Fundação Ezequiel Dias-FUNED), aprovado; Dr. Rodrigo Gribel Lacerda - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Eliane Novato Silva - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO  
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 04 de outubro de 2019.

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG)

Dr. Ary Correa Júnior (UFMG)

Dr. Cecília de Carvalho Castro e Silva (Universidade Presbiteriana Mackenzie-SP)

Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine (Fundação Ezequiel Dias-FUNED)

Dr. Rodrigo Gribel Lacerda - Coorientador (UFMG)

Dra. Eliane Novato Silva - Coorientadora (UFMG)

Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão - Orientador (UFMG)

*Leda Quercia Vieira*  
 Prof.<sup>a</sup> Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha mãe, Antônia, e meu pai, Paulo, por permitirem que eu caminhasse e chegasse até aqui. Vocês têm meu amor e gratidão eterna.

Agradeço à minha namorada, Alanna, pois tudo o que conquistei até este momento se deve a ela e ao amor que sentimos um pelo outro.

Ao meu orientador, prof. Dr. Paulo Beirão, por me dar o apoio científico e durante esses seis anos desde o mestrado. Ao meu co-orientador prof. Dr. Rodrigo Gribel, por me guiar pelos caminhos da Física, pelo apoio durante o doutorado me oferecendo conselhos valiosos e por me incentivar e motivar a continuar, e à minha co-orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Novato, por manter um diálogo constante e produtivo para o encaminhamento da tese.

Ao meu colega de trabalho e amigo Leonel Meireles, pois sua participação foi imprescindível para o desenvolvimento da plataforma de grafeno e sem ele este trabalho não seria finalizado. Também ao Vinícius Ornelas, pela engenhosidade na produção e fabricação do maquinário do laboratório. Agradeço ao pessoal do Laboratório de Nanomateriais: Ingrid, Alisson, Andreij, Edrian, Tiago, Igor, Cíntia, Natália, Ana Paula, Prof. Leonardo Campos, Prof. Miriano e ao Thiago Cunha, pela indispensável ajuda nos experimentos.

Agradeço aos técnicos Jamil do Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFMG e ao Sérgio e Antônio de Pádua do Departamento de Física/ UFMG. Ao professor Dawidson do Departamento de Bioquímica/UFMG, pelo auxílio na obtenção de imagens de microscopia.

Aos meus amigos Ana Cristina, Laura, Mariane, Bruno Repolês, Maurício, Leonardo e Vinícius, pelo apoio nessa jornada.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Minas Gerais.

## RESUMO

A aflatoxicose é a intoxicação provocada pela ingestão de aflatoxina por intermédio de alimentos e rações contaminados. Há um grande interesse tanto do meio acadêmico quanto tecnológico na utilização de sensores miniaturizados e relativamente baratos para a detecção de aflatoxina B<sub>1</sub>. O desenvolvimento de biossensores para diagnóstico é alvo de várias pesquisas e o grafeno surge como modelo para essa aplicação devido às suas propriedades físico-químicas únicas. A realização deste projeto proposto se justifica pela escassez de informações sobre os sensores efetivos da exposição à aflatoxina B<sub>1</sub>, dada ausência de biossensores que possibilitem esse diagnóstico e visa desenvolver método para ser utilizado como dispositivo do tipo *point-of-care* para detectar e quantificar a aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina oriundo da ingestão dietética de aflatoxina B<sub>1</sub>. O grafeno utilizado foi crescido por método de deposição química em fase vapor. Um método de transferência eletroquímica foi utilizado para se retirar o grafeno de seu substrato de crescimento. O dispositivo foi construído contendo um canal de silicone fechado com aberturas unicamente para entrada das soluções da reação e do eletrodo de medição. A área do grafeno foi delimitada por fotolitografia a pequenos retângulos microscópicos sobre contatos de ouro. O grafeno foi funcionalizado com uma solução contendo um *linker*, o ácido 1-pirenobutanoico éster *N*-hidroxisuccinimida, uma molécula capaz de interagir com o grafeno e proteínas. A condição intrínseca do grafeno construído em cada chip fabricado foi caracterizada eletricamente por curvas de corrente por tensão de fonte e dreno ( $I_{FD} \times V_{FD}$ ) para todos os conjuntos de eletrodos produzidos. Amostras obtidas do crescimento realizado no laboratório apresentam resistências da ordem de 800 a 3 k $\Omega$ . Para averiguar que o grafeno produzido era composto por uma monocamada, algumas medidas de espectroscopia Raman foram realizadas e ensaios de microscopia de fluorescência foram feitos para se determinar a adesão de anticorpos anti-aflatoxina ao grafeno. Com o intuito de utilizar o grafeno como um biossensor, foram avaliados o comportamento e a resposta deste ao efeito de campo por meio da verificação das curvas  $I_{FD} \times V_{FD}$ . Uma análise de microscopia de força atômica foi realizada para se visualizar a distribuição em nível nanométrico do conjunto *linker* e proteína. Os dados ilustram uma relação linear dentro da faixa de 0 a 50 nmol/L com  $R^2 = 0,977$ . O limite de detecção de aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina foi calculado em 3,26 nmol/L. Este trabalho apresenta como perspectivas empregar os sensores de grafeno para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina atribuindo confiabilidade no diagnóstico rápido de intoxicação e exposição à aflatoxina B<sub>1</sub>.

**Palavras-chave:** Aflatoxina B<sub>1</sub>. Grafeno. Biossensor. GFET.

## ABSTRACT

Aflatoxicosis is an intoxication caused by ingestion of aflatoxin through contaminated food and ration. There is great interest from both academia and industry in the use of relatively inexpensive miniaturized sensors for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub>. The development of diagnostic biosensors has been the subject of much research and graphene is a model for this application due to its unique physicochemical properties. The realization of this proposed project is justified by the scarcity of information about the effective exposure sensors to aflatoxin B<sub>1</sub>, given the absence of biosensors that allow this diagnosis and aims to develop a method to be used as a point-of-care device to detect and quantify aflatoxin B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanine from dietary ingestion of aflatoxin B<sub>1</sub>. The graphene used was grown by chemical vapor deposition method. An electrochemical transfer method was used to remove graphene from its growth substrate. The device was constructed containing a closed silicon channel with openings solely for the input of reaction solutions and the measuring electrode. The area of graphene was delimited by photolithography to small microscopic rectangles on gold contacts. Graphene was functionalized with a solution containing a linker, 1-pyrenobutanoic acid N-hydroxysuccinimide ester, a molecule capable of interacting with graphene and proteins. The intrinsic condition of the graphene built on each chip manufactured was electrically characterized by source and drain voltage curves ( $I_{SD} \times V_{SD}$ ) for all electrode assemblies produced. Samples obtained from the growth performed in the laboratory have resistances of 800 to 3 k $\Omega$ . To verify that the graphene produced was composed of a monolayer, some Raman spectroscopy measurements were performed and fluorescence microscopy assays were performed to determine the adhesion of anti-aflatoxin antibodies to the graphene. In order to use graphene as a biosensor, its behavior and response to the field effect were evaluated by checking the  $I_{SD} \times V_{SD}$  curves. An atomic force microscopy analysis was performed to visualize the nanometer level distribution of the linker and protein assembly. The data illustrate a linear relationship within the range of 0 to 50 nmol / L with  $R^2 = 0.977$ . The detection limit of aflatoxin B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanine was calculated at 3.26 nmol / L. This paper presents the prospects of employing graphene sensors for the detection of aflatoxin B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanine, providing reliability in the rapid diagnosis of aflatoxin B<sub>1</sub> poisoning and exposure.

**Keywords:** Aflatoxin B<sub>1</sub>. Graphene Biosensor. GFET.

## LISTA DE ABREVIACOES

---

AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua	Aflatoxina B <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Guanina
FET	Transistor de efeito de campo (do ingls <i>field-effect transistor</i> )
GFET	Transistor de efeito de campo de grafeno (do inglês <i>graphene field-effect transistor</i> )
NR-KS	cido norsolorínico sintase
NOR	cido norsolorínico
ACP	Proteína transportadora de acila
FAS	cido graxo sintase
AFQ <sub>1</sub>	Aflatoxina Q <sub>1</sub>
AFM <sub>1</sub>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
CYP	Citocromo P450
AFB <sub>1</sub> -8,9-epóxido	Aflatoxina B <sub>1</sub> -8,9-epóxido
mEH	Epóxido-hidrolases
AFAR	Aflatoxina-aldeído redutase
AFB <sub>1</sub> -8,9-dhd	Aflatoxina B <sub>1</sub> -8,9-diidrodiol
DL <sub>50</sub>	Dose letal 50%
LMT	Limites máximos tolerados
TLC	Cromatografia em camada delgada (do inglês <i>thin layer chromatography</i> )
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>gas chromatography</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> )
AFB <sub>1</sub> -Lys	Aflatoxina B <sub>1</sub> -lisina
$\lambda_D$	Comprimento de Debye
$I$	Força iônica
$V_G$	Tensão de <i>gate</i>
$E_F$	Nível de Fermi
CNP	Ponto de neutralidade de cargas ( <i>Charge Neutral Point</i> )
$I_{FD}$	Corrente de fonte e dreno
$V_{FD}$	Tensão de fonte e dreno
$V_{Dirac}$	Tensão de Dirac
GO	xido de grafeno (do inglês <i>graphene oxide</i> )
SPR	Ressonância de plásmon de superfície (do inglês <i>surface plasmon resonance</i> )
CVD	Deposio química por vapor (do inglês <i>chemical vapor deposition</i> )
PMMA	Polimetilmetacrilato
PET	Politereftalato de etileno
PDMS	Polidimetilsiloxano

HSA	Albumina sérica humana (do inglês <i>human serum albumin</i> )
AChE	Acetilcolinesterase
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>atomic force microscopy</i> )
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
PBSE	Ácido 1-pirenobutanoico éster <i>N</i> -hidroxisuccinimida
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i> )
q	Isotiocianato de fluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
MCPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
DHB	Ácido 2,5-diidroxibenzoico
anti-G.A.M	Anti-polivalente IgG, IgA, IgM humanos
AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -FAPY	Aflatoxina B <sub>1</sub> -8,9-formamidopiridina
L <sub>D</sub>	Limite de detecção
L <sub>Q</sub>	Limite de quantificação
K <sub>D</sub>	Constante de dissociação

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1 – Síntese de Aflatoxina B1 a partir de hexonoato pela NR-PKS. A via biossintética da aflatoxina começa com uma unidade de hexanoil-CoA acoplada à ACP e sete ciclos de alongamento com adições de malonil-CoA para produzir um intermediário linear C-20 (1). As barras cinza e preta representam os grupos adicionados. Ocorre uma reação de ciclização (2) que é subseqüentemente aromatizada e liberada do domínio da fosfopanteína (3). Reações adicionais produzem aflatoxina B1 (3b). A ausência de enzimas da via gera pirona por reação espontânea (4). Fonte: Adaptado de BARAJAS et al., 2017. .... 18
- Figura 2 – Metabolismo hepático de AFB1 A aflatoxina B1 pode ser metabolizada em diferentes compostos por ação de enzimas e citocromo no fígado de mamíferos e aves infectados. A desintoxicação (setas verdes) pode ocorrer via GST, hidrolase e redutases ou na conversão por citocromo P450 a produtos menos tóxicos e eliminados na urina. Já a genotoxicidade (setas vermelhas) ocorre pela ação de proteínas da família do citocromo P450 que geram AFBO e deste são formados aductos de DNA e proteínas. Como o metabolismo de xenobióticos ocorre no fígado, este órgão é o mais acometido pela atividade tóxica de AFB1 Fonte: Adaptado de DENG et al., 2018..... 21
- Figura 3 – Estrutura hexagonal do grafeno. Em (a) rede cristalina hexagonal do grafeno mostrando os vetores unitários da rede ( $a_1$  e  $a_2$ ). (b) A zona de Brillouin exibindo os pontos de alta simetria  $\Gamma$ , K e M e os pontos de Dirac (K e K'). (c) Estrutura de bandas tridimensional do grafeno, à direita em destaque encontro das bandas de energia em torno de um dos pontos de Dirac. Fonte: Adaptado de CASTRO-NEVES *et al.*, 2009. 27
- Figura 4 – Arquitetura básica de um GFET. O grafeno em uma placa de silício é utilizado como canal de transistor. Cada transistor é composto por três terminais: eletrodos metálicos de fonte e dreno e um portão. Fonte: <http://www.graphene-info.com/>..... 29
- Figura 5 – Representação esquemática do comprimento de Debye e sua influência na detecção de biomoléculas No centro da figura está uma esfera carregada negativamente e cargas livres com sinal oposto são atraídas em sua direção. O potencial formado pelas cargas diminui com a distância. Fonte: Adaptado de WOJCIK, 2012. .... 31
- Figura 6 – Curva de  $I_{FD} \times V_G$  para o grafeno não dopado ao se aplicar uma tensão de *gate*. Quando há um excesso de buracos, o nível de Fermi estará abaixo do ponto de Dirac (a). Assim, para elevar o nível de Fermi ao ponto Dirac, deve-se injetar elétrons ao grafeno, com um potencial de *gate* positivo, dopando tipo-n o grafeno (b). Com isso, o nível de energia de Fermi passará pelo ponto de Dirac e entrará no cone superior e agora há excesso de elétrons, dopagem tipo-p do grafeno, em (c) - Vermelho representa elétrons e azul buracos. Fonte: Adaptado de OUELLETTE, 2008. .... 33
- Figura 7 – Curvas de *gate* do grafeno para dopagem extrínseca tipo-n e tipo-p. Em (a), o grafeno intrinsecamente dopado com excesso de elétrons,  $V_G = 0$ ,  $E_F$  está acima do ponto de Dirac. Em (b), o grafeno intrinsecamente dopado com excesso de buracos,  $V_G = 0$ ,  $E_F$  está abaixo do ponto de Dirac. Fonte: Adaptado de MEIRELES, 2016. .... 34
- Figura 8 – Estrutura de biossensor genérico, mostrando que o analito é reconhecido por um e um transdutor o transforma em um sinal elétrico. Fonte: <https://www.surfix.nl/applications/biosensors>. .... 36

Figura 9 – Fotografia do forno e tubo de quartzo para crescimento do grafeno. Parte do sistema de CVD para produção de grafeno CVD no Laboratório de Nanomaterias da UFMG. Fotografia: Gustavo Arrighi Ferrari.....	40
Figura 10 – Esquema sequencial do processo de transferência úmida do grafeno para um substrato. O grafeno era crescido sobre lâminas de cobre e uma camada de PMMA era depositada sobre o grafeno e em seguida feita a corrosão da lâmina em persulfato de amônia, acompanhada de passagens em água para lavagem do grafeno. O PMMA era posteriormente retirado com acetona quando o grafeno já estava fixado ao substrato final. Fonte: Próprio autor. ....	41
Figura 11 – Esquema do processo de transferência eletroquímica com formação de bolhas de H <sub>2</sub> na solução alcalina. O grampo azul representa o ânodo, constituído pela lâmina de cobre e o grampo vermelho é o cátodo a barra de platina. Fonte: Próprio autor.....	42
Figura 12 – Arquitetura inicial do dispositivo simples Dispositivo simples com PDMS delimitando região com líquido e amostra a serem testados e contatos de prata nas extremidades do filme de grafeno. Fonte: Próprio autor.....	43
Figura 13 – Dispositivo com arquitetura mais sofisticada, evidenciado pelo conjunto de contatos de Au/Cr em (a) Fonte: Adaptado de ALMEIDA, 2013. Na microfotografia em (b), é possível visualizar o grafeno sobre os dois terminais do contato Au/Cr. Em (c) um modelo demonstrando o aspecto final do chip. Fonte: Próprio autor. ....	46
Figura 14 – Dispositivo utilizado nas análises. (a) Diagrama em corte do dispositivo com a piscina de PDMS posicionada sobre o dispositivo. (b) Ilustração do dispositivo com o arcabouço de PDMS. (c) Foto do dispositivo montado e com eletrodo de Ag/AgCl conectado. Fonte: Próprio autor.....	47
Figura 15 – Espectro típico obtido de uma medida por espectroscopia Raman de grafeno mostrando as principais características Raman, as bandas D, G e 2D. Fonte: Adaptado de MALARD <i>et al.</i> , 2009. ....	49
Figura 16 – Eletrodo de referência comercial. (a) Fotografia do eletrodo eDac ET069 e (b) sua representação interna. ....	52
Figura 17 – Esquema do processo de funcionalização do grafeno limpo, pronto para ser funcionalizado, com PBSE e com antígeno ligado. Partes ainda expostas do grafeno e do PBSE bloqueadas com etanolamina. A proteína funcionalizada no grafeno e o seu ligante devem estar dentro do comprimento de Debye. Fonte: Adaptado de OKAMOTO <i>et al.</i> , 2012. ....	54
Figura 18 – Espectro de absorbância ultravioleta de AFB <sub>1</sub> em metanol cedido pela prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Jovita Gazzinelli, da FUNED. Na figura é possível observar um pico largo na região de 340-360 nm, característico da aflatoxina B <sub>1</sub> de acordo com o <i>Official Methods of Analysis. Natural Toxins</i> , Cap. 19, 2012.....	57
Figura 19 – Gráfico de medida característica da medida do comportamento resistivo do dispositivo. Curva ôhmica com resistência de aproximadamente 1,0 kΩ com V <sub>FD</sub> de -100 mV até 100 mV, tipicamente observado nos grafenos CVD obtidos no Laboratório de Nanomateriais. ....	59
Figura 20 – Espectro Raman de filme de grafeno CVD. Medida obtida pela média de sete espectros oriundos de um mesmo filme de grafeno. É possível observar as bandas 2D (2.700 cm <sup>-1</sup>	

<sup>1</sup> ), G (1.580) e D (1.350 cm <sup>-1</sup> ), a largura de meia altura da banda 2D é de aproximadamente 30 cm <sup>-1</sup> . .....	61
Figura 21 – Gráfico de corrente de fuga característico do dispositivo com eletrodo de referência comercial, exibindo a corrente $I_{FD}$ da ordem de 10 <sup>3</sup> vezes menor que a observada em todos os experimentos, dentro da faixa de $V_G$ utilizada ao longo do trabalho. ....	62
Figura 22 – Esquema dos testes de pH. Ilustração de como um fluxo de solução pelo canal é ajustado. Seringa contendo a solução entregue ao dispositivo.....	63
Figura 23 – Gráfico das curvas para solução com pH 4-11. O experimento foi realizado com soluções de HCl e NaOH nos pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. No <i>inset</i> está a relação entre o valor de tensão no ponto de Dirac pelo pH. ....	64
Figura 24 – Gráfico das curvas para solução com pH 6-8. O experimento foi realizado com soluções de PBS ajustado aos pH 6,0; 6,3; 6,6; 7,0; 7,3; 7,6 e 8,0. No <i>inset</i> está a relação entre o valor de tensão no ponto de Dirac pelo pH.....	65
Figura 25 – Gráfico do resultado da variação da corrente em função do tempo. A tensão de fonte-dreno e tensão de <i>gate</i> eram fixas em 100 mV para ambas. As setas indicam o momento em que um novo PBS com pH diferente é adicionado. ....	66
Figura 26 – Formação da bicamada que induz cargas no grafeno devido a organização dos íons de OH <sup>-</sup> e H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> na interface grafeno/solução. A adsorção de OH <sup>-</sup> induz buracos no grafeno, dopando-o tipo- <i>p</i> (a), com isso a curva de <i>gate</i> se transloca para direita do eixo de $V_G$ (b), indicando uma transferência de elétrons do grafeno para a solução.....	67
Figura 27 – Gráfico das curvas de <i>gate</i> em diferentes etapas da funcionalização. A funcionalização do grafeno com o PBSE promove uma dopagem tipo- <i>p</i> no grafeno. A funcionalização do grafeno com PBSE+HSA, promove uma dopagem tipo- <i>n</i> no sistema, fazendo com que a mobilidade elétrica volte para valores próximos às do grafeno sem funcionalização. ....	69
Figura 28 – Imagens de microscopia de fluorescência de lâminas de vidro decoradas com albumina e caseína. Em (a) HSA diretamente no grafeno, mostrando pontos de aglomeração em sua superfície. Em (b), com a adição de PBSE, a HSA se distribui majoritariamente uniforme ao longo da superfície do grafeno. Em (c) caseína diretamente no grafeno, mostrando poucas regiões onde o anticorpo anti-HSA aderiu ao grafeno. Em (c) caseína e PBSE, mostrando quase nenhuma região onde o anticorpo anti-HSA aderiu ao grafeno. ....	70
Figura 29 – Microscopia de força atômica do grafeno funcionalizado e não funcionalizado com PBSE+HSA. Em (a) microscopia de força atômica mostrando área de grafeno sem proteína e não funcionalizado. Em (b) área do grafeno funcionalizado e com grafeno, exibindo uma distribuição quase uniforme de albumina e alguns pontos de maior relevo. Em (c) perspectiva de relevo do grafeno sem HSA+PBSE e em (d) com HSA+PBSE. Em (e), gráfico do perfil de relevo de (a) e (b).....	73
Figura 30 – Gráfico da absorvância em 294 nm para a acetilcolinesterase no grafeno. Em azul, AChE foi adicionada ao grafeno com e sem PBSE. Em vermelho foi adicionado apenas ATCh e DTNB, sem AChE, para verificação da hidrólise espontânea do substrato presente ou não. Em verde, apenas o DTNB, para verificação de sua hidrólise espontânea. Virtualmente não há a presença dos sinais de ATCh e DTNB na presença de <i>linker</i> .....	74

Figura 31 – Clivagem da acetilcolina pela acetilcolinesterase. ....	75
Figura 32 – Gráfico corrente por tempo do sinal específico da catálise pela AChE. Indicado no gráfico as inserções de proteína Ig (não-específica), acetilcolina 3,33 mmol/L e PBS, lavando o sistema, em cada uma das setas. ....	76
Figura 33 – Gráfico das curvas para cinética catalítica de AChE. Diferentes concentrações de acetilcolina foram utilizadas para avaliar o perfil catalítico da enzima AChE. No <i>inset</i> está a relação entre o valor de tensão no ponto de Dirac pela concentração de acetilcolina, exibindo uma curva cinética hiperbólica similar à Michaelis-Menten. ....	77
Figura 34 – Resultado da medida do biossensor, com as setas indicando o momento em que as soluções anti-HSA (vermelha), apenas PBS (preta) e anticorpo não-específico (verde) foram inseridas no sistema. ....	79
Figura 35 – Gráfico de todas as curvas $I_{FD} \times V_G$ para várias concentrações de anti-HSA adicionadas ao canal de grafeno. As curvas com mesma concentração foram separadas por conjunto de cores, visualizadas quase que sobrepostas. No <i>inset</i> , gráfico mostrando o valor do ponto de Dirac com o aumento da concentração de HSA. ....	82
Figura 36 – Cromatografia em fase reversa das fases orgânica e aquosa da reação de síntese de AFB <sub>1</sub> . Na imagem (a) está a fração aquosa, tampão fosfato, onde é possível observar tanto dióis e ésteres de AFB <sub>1</sub> quanto o aducto de AFB <sub>1</sub> -guanina. Na imagem (b), pico de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua da fase orgânica, após um passo de separação. Ensaios de HPLC em C-18 com fluxo de 1,0 mL/min da fase móvel e leitura a 360 nm. ....	84
Figura 37 – Espectrometria de massa da fração orgânica separada de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. Ensaio de MALDI-TOF onde é possível observar composto com $m/z$ de 478,69, próximo à massa monoisotópica de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. ....	85
Figura 38 – Ensaio de microscopia de fluorescência com grafeno CVD na presença de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua e produtos secundários da síntese. Em (a) microscopia de fluorescência com grafeno CVD apenas com bloqueio de PEG-6000. Em (b), grafeno sensibilizado com produtos secundários da síntese de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. Em (c), grafeno sensibilizado com fração cromatográfica com AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. ....	86
Figura 39 – Medida ao longo do tempo do ponto de Dirac do sensor de grafeno com a detecção específica de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. Em cada uma das regiões nomeadas significa a medida da curva $V_G \times I_{FD}$ na presença do analito indicado. ....	87
Figura 40 – Curvas curva $I_{FD} \times V_G$ no chip de grafeno com AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. Concentrações crescentes de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua são observadas da esquerda para a direita. ....	89
Figura 41 – Relação linear entre concentração de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua e o ponto mínimo de corrente (Ponto de Dirac) para as diferentes concentrações testadas. ....	89
Figura 42 – Curvas de $I_{FD} \times V_G$ de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua obtidas até a saturação do sistema. As concentrações são crescentes da esquerda para a direita. ....	92
Figura 43 – Curva ajustada da diferença do ponto mínimo de corrente em relação às concentrações de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. No <i>inset</i> , a curva ajustada ao modelo linear para as concentrações iniciais de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua. ....	93

## SUMÁRIO

---

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Aflatoxina B1 .....	15
1.1.1	<i>Aflatoxicose</i> .....	18
1.1.2	<i>Metabolismo de AFB1</i> .....	19
1.1.3	<i>Efeitos econômicos</i> .....	21
1.1.4	<i>Detecção</i> .....	23
1.2	Biossensores .....	25
1.3	Grafeno .....	25
1.3.1	<i>Transistor de Efeito de Campo de grafeno</i> .....	28
1.4	Eletroquímica .....	29
1.4.1	<i>Comprimento de Debye</i> .....	30
1.4.2	<i>Gate Eletroquímico</i> .....	32
1.5	Grafeno como biossensor .....	35
2	OBJETIVOS .....	38
2.1	Objetivos específicos: .....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Obtenção do grafeno CVD .....	39
3.2	Transferência de grafeno para chip de Si/SiO <sub>2</sub> .....	41
3.3	A arquitetura do dispositivo.....	43
3.3.1	<i>Arquitetura com contatos metálicos por fotolitografia e caracterização por microscopia óptica</i> .....	44
3.4	Caracterização do grafeno por espectroscopia Raman.....	48
3.5	Caracterização por microscopia de força atômica.....	50
3.6	Caracterização Elétrica.....	50
3.7	Eletrodo de Referência de Ag/AgCl.....	52
3.8	Funcionalização do Grafeno .....	53
3.8.1	<i>Caracterização da funcionalização com proteínas</i> .....	54
3.8.2	<i>Análises da funcionalização e atividade dos anticorpos anti-aflatoxina</i> .....	55
3.9	Síntese de Aflatoxina B <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Guanina .....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Caracterização elétrica dos chips não-funcionalizados.....	58
4.2	Caracterização do grafeno CVD por espectroscopia Raman .....	59
4.3	Grafeno como Sensor de pH .....	61
4.4	Caracterização da Funcionalização .....	68
4.5	Caracterização topográfica .....	72
4.5.1	<i>Resposta elétrica pós-funcionalização</i> .....	74
4.6	Sensor de acetilcolina .....	75
4.7	Detecção albumina humana .....	78
4.8	Caracterização da síntese de AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Guanina .....	82
4.9	Caracterização óptica do reconhecimento do anticorpo anti-AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua.....	85
4.10	Ensaio de detecção de aflatoxina.....	86
5	CONCLUSÃO .....	95
	REFERÊNCIAS .....	97

# 1 INTRODUÇÃO

---

As aflatoxinas são uma classe de micotoxinas produzidas pelo metabolismo secundário de *Aspergillus* sp. e possuem propriedades carcinogênicas. Esses fungos normalmente crescem em cereais e grãos mal armazenados, como milho, amendoim, arroz, trigo e alguns outros condimentos (IQBAL, SHAHZAD ZAFAR *et al.*, 2014). A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é produzida primariamente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, conhecidos por serem largamente distribuídos na natureza, além dessa toxina ser classificada como Grupo I de carcinógenos humanos pela *International Agency for Research on Cancer* (DAI *et al.*, 2017). O metabolismo via citocromo P450 de AFB<sub>1</sub> produz um produto altamente mutagênico pela ligação à guanina, a aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanina (AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua), que pode ser utilizado como marcador de exposição. Este biomarcador ou seus metabólitos residuais em órgãos ou fluidos biológicos, pode ser monitorado e medido via interação com anticorpos específicos em um biossensor.

Há um grande interesse tanto do meio acadêmico quanto tecnológico na utilização de sensores miniaturizados e relativamente baratos para a detecção de moléculas de importância biomédica, como marcadores de exposição à AFB<sub>1</sub>. Mais recentemente, dispositivos elétricos funcionando como transistores de efeito de campo (do inglês, *field-effect transistor* ou FET) já são aplicados de forma comercial (STRAKOSAS; BONGO; OWENS, 2015). O desenvolvimento de sensores em escala nanométrica, os quais possuem uma alta relação área/superfície, permite que biomoléculas com dimensões próximas às do próprio sensor possam ser detectadas. Este fator dá maior sensibilidade aos sensores elétricos, pois gera maior interação de espécies químicas com a superfície de sensoriamento (PUMERA, 2011). Alguns trabalhos já mostraram plataformas de grafeno, alótropo cristalino do carbono disposto em uma estrutura hexagonal com um átomo de espessura, como biossensor para os estudos de interações proteicas e ensaios enzimáticos (ZHU *et al.*, 2010; JUSTINO *et al.*, 2017). Entre suas diversas propriedades, a capacidade de conduzir corrente elétrica torna-o um

---

excelente potenciômetro e um transistor de efeito de campo (GFET, do inglês *graphene field-effect transistor*) (SCHWIERZ, 2010).

Com o intuito de criar metodologia eficiente e relativamente simples que possam fornecer informação a respeito da exposição à AFB<sub>1</sub>, o objetivo geral deste estudo é desenvolver um sensor tipo *point-of-care* para quantificação de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua.

## 1.1 Aflatoxina B<sub>1</sub>

As micotoxinas são metabólitos secundários que os fungos produzem para proteção e evitar competições ao se proliferar. Essas toxinas podem contaminar direta ou indiretamente cereais e grãos consumidos na dieta de seres humanos e animais (PATERSON; LIMA, 2010). Quando causam intoxicações, as micotoxinas têm um diagnóstico muito complexo, pois, em muitos casos, sintomas brandos podem facilmente ser confundidos com outras doenças de origem microbiana. Cada uma dessas toxinas pode afetar um órgão ou sistema de forma específica, dadas as suas propriedades físico-químicas e a espécie envolvida, induzindo um conjunto de sinais e sintomas cuja natureza pode ser aguda ou crônica (PATERSON; LIMA, 2010).

Aflatoxinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* e têm seu nome derivado de uma das espécies que as produz, *A. flavus*. O termo foi cunhado devido à descoberta dessa classe de micotoxinas na Inglaterra na década de 1960. Mais de 100.000 perus (*Meleagris gallopavo*) morreram de forma misteriosa durante maio e agosto de 1960 e, apesar de galinhas e patos também serem susceptíveis à doença, ela foi chamada de doença “X” dos perus. As aves apareciam mortas dentro de uma semana após apresentarem sintomas de perda do apetite, diminuição da mobilidade, fraqueza das muscular e lesões necróticas no fígado (FONSECA, 2012). As aves mortas adotavam posição opistótona, postura na qual a coluna vertebral forma um arco côncavo para trás, indicando espasmos dos músculos axiais das costas resultantes de intoxicação. Análises *post-mortem*

---

dos fígados afetados indicaram a presença de toxinas produzidas pelo fungo *A. flavus* e então designadas de aflatoxinas, oriundas de ração feita a base de paçoca importada do Brasil (CARNAGHAN; SARGEANT, 1961; NESBITT *et al.*, 1962). As subclasses dessas toxinas foram inicialmente denominadas de B e G pois produzem fluorescências azul (*blue*) e verde (*green*) sob luz ultravioleta (DE VOGEL; VAN RHEE; KOELENMID, 1965).

As aflatoxinas são produzidas pelo metabolismo secundário de fungos do gênero *Aspergillus*, sendo que *A. flavus* produz apenas as aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>) e *A. parasiticus* produz também as aflatoxinas G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (VERHEECKE; LIBOZ; MATHIEU, 2016). Todas essas quatro aflatoxinas são altamente tóxicas aos seres humanos e mamíferos, pois são classificadas como hepatotóxicas, nefrotóxicas e imunotóxicas. Porém, a AFB<sub>1</sub> também é carcinogênica e sua exposição para humanos e animais de criação é fortemente regulada para se evitar contaminações (IARC, 2012).

Várias soluções foram apresentadas para se evitar a contaminação de alimentos por AFB<sub>1</sub>, como fungos que funcionam como competidor durante o crescimento de *Aspergillus*, comercialmente chamado de aflu-Guard<sup>®</sup> (DORNER; LAMB, 2006) ou o gerenciamento de temperatura e atividade de água na estocagem dos grãos (WARBURTON; WILLIAMS, 2014). Isso resolve só parte do problema, uma vez que *A. flavus* é termotolerante e cresce na faixa de temperatura de 10 a 50 °C e em condições de umidade acima de 11%, o que o torna capaz de crescer onde outros fungos não conseguem, enquanto a produção de AFB<sub>1</sub> pelo fungo ocorre na temperatura ótima de 37 °C (GALLO *et al.*, 2016).

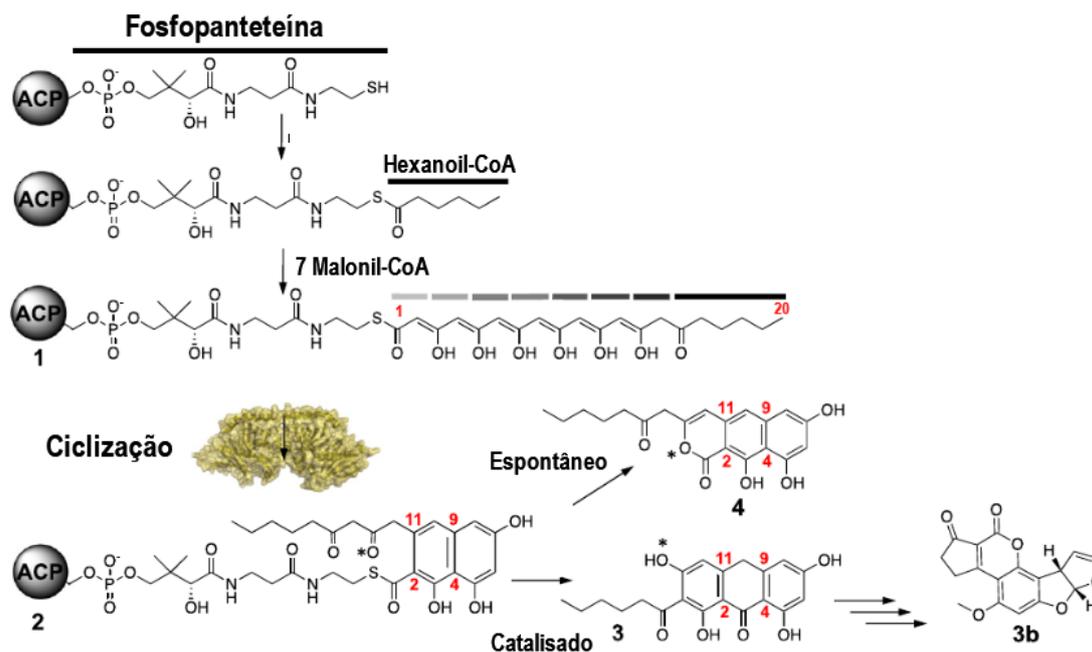
A aflatoxina B<sub>1</sub> é um derivado secundário da síntese de ácidos graxos pela ação do complexo multi-enzimático policetídeo sintase, a ácido norsolorínico sintase (NR-PKS, EC 2.3.1.221) que produz ácido norsolorínico (NOR) a partir de acetil-CoA (BARAJAS *et al.*, 2017). A rota é visualizada na Figura 1 e começa com a síntese de hexanoato na síntese de ácidos graxos pela NR-

---

PKS, com auxílio de duas subunidades da ácido graxo sintase (FAS), que então seletivamente prepara a proteína transportadora de acila (ACP) com uma unidade inicial de hexanoil-CoA e adiciona sete extensores de malonil-CoA ao hexanoato para formar um policetídeo C-20 de cadeia linear. Este composto permanece ligado covalentemente à NR-PKS por intermédio da fosfopanteteína e é ciclizado por uma tioesterase à norantrona antes de ser liberado da enzima e convertido à NOR, primeiro intermediário estável da via em um processo pouco conhecido. Após isso, várias etapas catalíticas levam à formação de AFB<sub>1</sub> (YU, 2012).

A aflatoxicose é a intoxicação provocada pela ingestão de aflatoxina por intermédio de alimentos e rações contaminados. Em condições favoráveis de temperatura e umidade os fungos que crescem em certas rações e alimentos podem ser induzidos a produzir aflatoxinas. Entretanto, a aflatoxina B<sub>1</sub> é geralmente predominante, sendo também a mais tóxica.

Os animais de corte, o que inclui de aves domésticas, podem ser expostos a AFB<sub>1</sub> e outras aflatoxinas pelo consumo de ração contaminada. Muitos insumos agrícolas como o milho, amendoim e sorgo, assim como grãos alimentícios possuem grandes chances de serem contaminados por fungos do gênero *Aspergillus*. O estresse causado pela diminuição da disponibilidade de água ou danos impostos por insetos pode reduzir a resistência das culturas e levar à contaminação por aflatoxinas antes mesmo da colheita (MOHAJERI *et al.*, 2018; WARBURTON; WILLIAMS, 2014).



**Figura 1** – Síntese de Aflatoxina B1 a partir de hexanoato pela NR-PKS. A via biossintética da aflatoxina começa com uma unidade de hexanoil-CoA acoplada à ACP e sete ciclos de elongamento com adições de malonil-CoA para produzir um intermediário linear C-20 (1). As barras cinza e preta representam os grupos adicionados. Ocorre uma reação de ciclização (2) que é subsequentemente aromatizada e liberada do domínio da fosfopanteteína (3). Reações adicionais produzem aflatoxina B1 (3b). A ausência de enzimas da via gera pirona por reação espontânea (4). **Fonte:** Adaptado de BARAJAS et al., 2017.

### 1.1.1 Aflatoxicose

Condições úmidas com temperaturas mais elevadas durante o armazenamento, a colheita ou no transporte favorecem o crescimento e colonização por *Aspergillus* com subsequente produção de aflatoxinas. Além da contaminação primária de certas culturas agrícolas, as aflatoxinas podem ser transferidas para o leite, carne e ovos de animais que ingeriram as toxinas (PIER, 1992). A AFB<sub>1</sub> é um grande risco à segurança alimentar em produtos vegetais e animais para seres humanos.

A intoxicação aguda por AFB<sub>1</sub> é caracterizada em mamíferos por uma ataxia, letargia, palidez de pelos e pele, perda de peso e hepatomegalia. Já a intoxicação crônica inclui icterícia, ineficiência da alimentação induzida, queda da produção de leite, além da perda de apetite (MONSON;

---

COULOMBE; REED, 2015). Os sintomas da aflatoxicose grave incluem a necrose hemorrágica do fígado, aumento da quantidade de ductos biliares com edema e letargia.

Algumas espécies possuem susceptibilidades diferentes à aflatoxicose, sendo a dose letal mínima para as espécies menos resistentes, como os coelhos e os patos, em torno de 0,3 mg/kg, enquanto as galinhas e os ratos, com maior tolerância, de 18 mg/kg (WILLIAMS *et al.*, 2004). Humanos adultos têm alta tolerância às aflatoxinas e geralmente são as crianças que morrem nos casos relatados de intoxicações agudas (MOHAJERI *et al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2004).

### **1.1.2 Metabolismo de AFB<sub>1</sub>**

A molécula de aflatoxina por si só não é tóxica, ela necessita passar por determinado processamento para se tornar biologicamente ativa. Esta bioativação ocorre predominantemente em hepatócitos, através da catálise por citocromos ou por lipoxigenases e prostaglandina sintase (BEDARD; MASSEY, 2006).

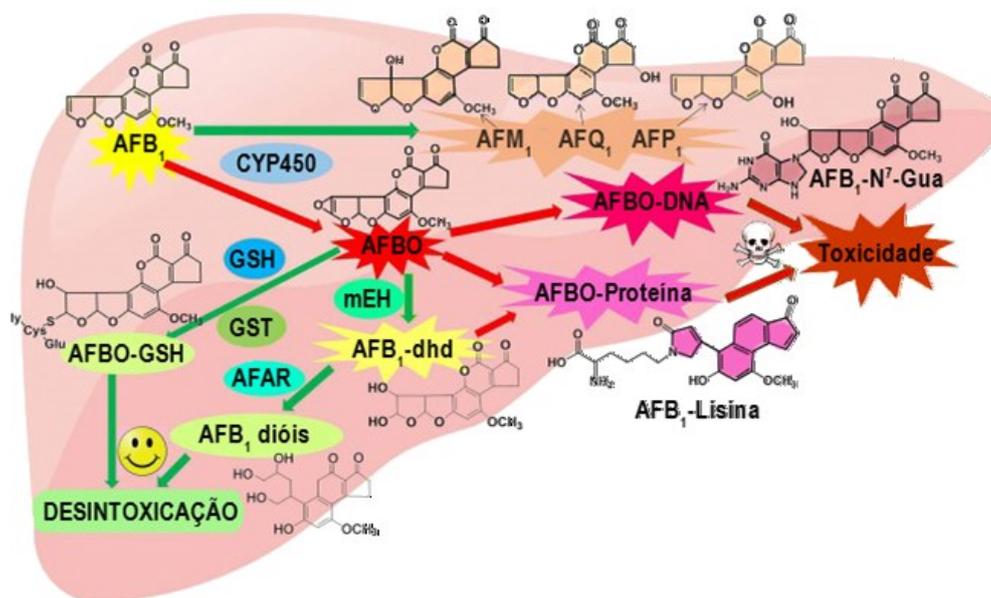
A AFB<sub>1</sub> pode ser metabolizada em diversos compostos, um dos principais excretado no leite e urina de vacas leiteiras e outras espécies de mamíferos que tenham consumido alimento ou ração contaminada é a aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) (PIER, 1992). Em média, de 0,3 a 6,2% de toda a AFB<sub>1</sub> é metabolizada para AFM<sub>1</sub>. Ainda que seja considerada uma detoxificação, a AFM<sub>1</sub> ainda retém muito das propriedades carcinogênicas AFB<sub>1</sub> (IQBAL, S.Z. *et al.*, 2015), mais do que outros compostos originados do metabolismo de xenobióticos como a aflatoxina Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>). A AFQ<sub>1</sub> é excretada na urina, assim como AFM<sub>1</sub> (YU, 2012).

A biotransformação de AFB<sub>1</sub> é produzida pela ação de proteínas da superfamília do citocromo P450 (CYP) em microsossomos hepáticos. Diversos membros da superfamília estão envolvidos na produção de diferentes metabólitos. A CYP1A2, responsável por até 95% da metabolização total de AFB<sub>1</sub>, cataboliza este por meio de oxidação gerando *exo* e *endo*-AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido e AFM<sub>1</sub>, já

CYP3A4 quebra AFB<sub>1</sub> em *exo*-AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido e AFQ<sub>1</sub> (EATON, D L; GALLAGHER, 1994). A AFB<sub>1</sub> pode ser eliminada via ação de glutatona-S-transferase que conjuga a aflatoxina à glutatona, ou por epóxido-hidrolases (mEH) ou aflatoxina-aldeído redutases (AFAR), que formam intermediários menos tóxicos, como AFB<sub>1</sub>-8,9-diidrodiol (AFB<sub>1</sub>-8,9-dhd). O AFB<sub>1</sub>-8,9-dhd através de uma série de reações pode gerar aductos com resíduos de lisina em proteínas. (DENG *et al.*, 2018) (Figura 2). Ainda que mEH e AFAR estejam envolvidas na desintoxicação de AFB<sub>1</sub> em humanos, não se tem conhecimento na participação delas em animais (TULAYAKUL *et al.*, 2005).

A bioativação de AFB<sub>1</sub> que ocorre pela formação de um grupo reativo epóxi na dupla ligação no anel furano, gera um intermediário instável eletrofílico que é capaz de alquilar tanto proteína quanto ácidos nucleicos, chamado de AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido (AFBO), encontrado na forma *exo*-epóxido e *endo*-epóxido. Com uma meia-vida de 1 s em solvente aquoso, a forma *exo*-epóxido é capaz de reagir com DNA e formar aductos de DNA com eficiência de 98% (BEDARD; MASSEY, 2006; DENG *et al.*, 2018). O N<sup>7</sup> da guanina é capaz de realizar um ataque nucleofílico ao grupo epóxi e forma um aducto de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina (Figura 2), cujo destino *in vivo* pode seguir três destinos: (1) liberação de AFB<sub>1</sub>-8,9-dhd restaurando um sítio de guanina no DNA; (2) reparo de excisão de base levando a um sítio apurínico, ou (3) hidrólise básica do anel imidazólico da guanina gerando um aducto estável AFB<sub>1</sub>-formamidopirimidina (AFB<sub>1</sub>-FAPY) (BEDARD; MASSEY, 2006; EATON, D L; GALLAGHER, 1994). Estudos demonstram que tanto AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua quanto AFB<sub>1</sub>-FAPY podem ser removidos através do sistema de reparo de excisão de nucleotídeo (NER) em mamíferos (LEADON; TYRRELL; CERUTTI, 1981), porém AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua é muito mais susceptível a este tipo de reparo que AFB<sub>1</sub>-FAPY, uma vez que este último causa menos deformação estrutural à dupla fita de DNA (DENG *et al.*, 2018). Como o NER é um sistema que evoluiu para reconhecer erros oriundos de diferentes fontes, o reparo de base pode levar a uma mutação de G→T (DAI *et al.*, 2017; DENG *et al.*, 2018). Os aductos de DNA e RNA de AFB<sub>1</sub> podem inibir a transcrição e a tradução, induzir

mutações de DNA durante o reparo e a replicação e até mesmo iniciar apoptose ou carcinogênese (MONSON; COULOMBE; REED, 2015).



**Figura 2** – Metabolismo hepático de AFB<sub>1</sub> A aflatoxina B<sub>1</sub> pode ser metabolizada em diferentes compostos por ação de enzimas e citocromo no fígado de mamíferos e aves infectados. A desintoxicação (setas verdes) pode ocorrer via GST, hidrolase e redutases ou na conversão por citocromo P450 a produtos menos tóxicos e eliminados na urina. Já a genotoxicidade (setas vermelhas) ocorre pela ação de proteínas da família do citocromo P450 que geram AFBO e deste são formados aductos de DNA e proteínas. Como o metabolismo de xenobióticos ocorre no fígado, este órgão é o mais acometido pela atividade tóxica de AFB<sub>1</sub> **Fonte:** Adaptado de DENG et al., 2018.

### 1.1.3 Efeitos econômicos

Além de ser altamente tóxica para o organismo humano, a AFB<sub>1</sub> afeta negativamente a produção da indústria avícola, resultando em perdas econômicas. A exposição à AFB<sub>1</sub> na dieta de aves leva a um menor ganho de peso e diminuição da eficiência do uso de nutriente (CARNAGHAN; SARGEANT, 1961; MONSON; COULOMBE; REED, 2015). A AFB<sub>1</sub> reduz a conversão alimentar, fazendo com que as aves domésticas exijam mais alimento para produzir carne e ovos (FONSECA, 2012). De acordo com o relatório do *Council for Agricultural Science and Technology*, os prejuízos devidos a aflatoxinas na indústria avícola dos Estados Unidos ultrapassam o valor de US\$ 143 milhões por ano (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010). Culturas agrícolas contaminadas com

---

aflatoxinas são um problema mundial e aproximadamente 25% do suprimento mundial de alimentos está contaminado com micotoxinas (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

O consumo de alimentos contaminados com AFB<sub>1</sub> resulta em diminuição do peso corporal e dos órgãos, imunossupressão, morbidade e mortalidade em perus e aves de criação (MONSON; COULOMBE; REED, 2015; VIEGAS *et al.*, 2016). As aflatoxinas levam a danos hepáticos irreversíveis, assim como alterações de enzimas hepáticas, dos padrões de coagulação sanguínea e modificações histológicas como necrose hepatocelular e hiperplasia biliar em aves de criação. Estudos mostram que a administração de 2,5 mg/kg de AFB<sub>1</sub> foi capaz de reduzir até 10% o consumo de ração e a ingestão de 10,0 mg/kg levou à morte de embriões de aves (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010; VIEGAS *et al.*, 2016). A dose letal (DL<sub>50</sub>) para a maioria das espécies considera-se que varia entre 1 e 50 mg/kg, com um nível de toxicidade crítico inferior a 1 mg/kg em algumas espécies altamente suscetíveis, como aves, peixes e ratos (GURBAN *et al.*, 2017).

As aflatoxinas são quase impossíveis de se eliminar, isso devido aos fungos crescerem em condições adversas à maioria dos outros durante o armazenamento. A maioria das pesquisas são focadas nos efeitos do processamento de grãos e cereais (DORNER; LAMB, 2006; PATERSON; LIMA, 2010). As tecnologias visam reduzir as concentrações totais de aflatoxinas e outras micotoxinas, porém os preparos de alimentos geralmente podem não garantir sua remoção por completo. A aflatoxina B<sub>1</sub> tem uma estabilidade muito alta, atingindo temperaturas de degradação por volta de 237 a 406 °C (PANKAJ; SHI; KEENER, 2018), com isso, as condições de processamento e preparação doméstica de alimentos não conseguem eliminar por completo a micotoxina (IQBAL, S.Z. *et al.*, 2015; PATERSON; LIMA, 2010). Ainda que novas tecnologias estejam sendo estudadas para a descontaminação de AFB<sub>1</sub> de alimentos domésticos, como o uso de ozônio e irradiação por feixe de elétrons, muitas dessas possuem o preço como um fator impeditivo para países em desenvolvimento (PANKAJ; SHI; KEENER, 2018; WANG, SHI-QING *et al.*, 2015).

Do ponto de vista puramente econômico, as aflatoxinas são a classe de micotoxinas mais problemáticas na agricultura. As estimativas do impacto mercadológico são importantes para definir os benefícios de implementar estratégias na indústria e o valor dessas para mitigar os problemas das micotoxinas (MITCHELL *et al.*, 2016). Além disso, a mudança climática pode causar aumento na contaminação por aflatoxina no mundo que dependem da produção de grãos, como milho e arroz (UDOMKUN *et al.*, 2017)

Segundo o relatório anual do *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) de 2012, as micotoxinas foram a principal ocorrência de notificações para rejeição de importados nas aduanas da União Europeia, com aflatoxinas, ocratoxinas e zearalenona contabilizando por quase 99% de todos os casos (PRADO, 2017). Antes de 2012, a legislação regulamentária do Brasil restringia-se à contaminação por AFB<sub>1</sub> em amendoins destinados ao consumo humano e em milho para a alimentação animal. No entanto, em 2012 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) propôs limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas, como fumonisinas, zearalenona, ocratoxina A e aflatoxinas, na RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011 e alterada pela RDC n° 138, de 8 de fevereiro de 2017 (ANVISA, 2011).

#### **1.1.4 Detecção**

Atualmente existem várias técnicas disponíveis para determinar os níveis de AFB<sub>1</sub> em alimentos e amostras biológicas. A maioria das técnicas requer ao menos uma extração para remover a aflatoxina de misturas complexas de materiais nos quais é encontrada, uma purificação para remover interferentes e, finalmente, a detecção e quantificação. As técnicas mais utilizadas por laboratórios analíticos para purificar aflatoxina empregam alguma forma de cromatografia, que incluem, cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (GROOPMAN *et al.*, 1985). Em TLC, o limite de detecção para AFB<sub>1</sub> é de 1,0 µg/kg

(CASTRO; VARGAS, 2001) e para métodos de HPLC esse limite pode chegar até 0,2 ng/g (CHOOCHUAY *et al.*, 2018). Esses métodos são padrões-ouro dentro da química analítica e amplamente aceitos, no entanto, são frequentemente vistos como trabalhosos e demorados, exigindo um investimento financeiro em equipamentos, manutenção e mão-de-obra qualificada (CARLSON, 2000).

Algumas técnicas mais modernas de detecção de aflatoxinas fazem uso de métodos imunológicos, que utilizam anticorpos específicos para AFB<sub>1</sub> para capturar e detectar a micotoxina de meios complexos. Essas técnicas utilizam a propriedade de anticorpos serem biomoléculas que identificam e se ligam fortemente um antígeno específico e isso tem sido explorado para permitir uma identificação de antígenos muito sensíveis. Existem vários ensaios baseados em imunologia que são usados para detectar aflatoxina (EATON, DAVID; GROOPMAN, 1993).

Em métodos imunológicos, como ELISA, é necessário que os anticorpos estejam marcados com alguma molécula geradora de sinal, necessitando de reações acopladas para isso. Há um empecilho na utilização de anticorpos para detecção de aflatoxinas, pois são moléculas menores que a maioria dos imunogênicos. Assim, aflatoxinas normalmente precisam ser quimicamente modificadas com proteínas carreadoras e é importante sintetizar um hapteno que imite as propriedades físico-químicas das moléculas-alvo (MATABARO *et al.*, 2017). Os métodos de imunoensaio geralmente reconhecem os antígenos de um complexo estável, que é então detectado e analisado (CARLSON, 2000).

Como a AFB<sub>1</sub> é metabolizada em AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua e AFB<sub>1</sub>-Lys no fígado, esses compostos são comumente empregados como biomarcadores de exposição alimentar à AFB<sub>1</sub> em estudos epidemiológicos, pois AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua é comumente excretada na urina, enquanto a AFB<sub>1</sub>-Lys é circulante no sangue (JAGER *et al.*, 2016). Portanto, AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua é empregada como biomarcador de curto e longo prazo da exposição à AFB<sub>1</sub>, através da dieta.

## 1.2 Biossensores

Biossensor é conceituado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) como um dispositivo que utiliza reações bioquímicas específicas por intermédio de enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos usualmente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos (IUPAC, 1992). Este tipo de sensor está ligado a um transdutor de sinal capaz de reconhecer com alta especificidade biomoléculas, o que os têm tornado tão divulgados e aplicados, por exemplo, em diagnósticos clínicos e controle ambiental (TURNER, 1987). De acordo com esta definição estrita, tubos e tiras de teste para diagnóstico devem ser considerados dosímetros e não verdadeiros sensores, uma vez que não é possível detectar oscilações de concentração do analito. Além disso, esses instrumentos carecem de um sinal contínuo e proporcional à concentração. Um sensor químico ou biológico deve ser mais barato e versátil do que os tradicionais aparelhos analíticos mais complexos.

O desenvolvimento e aprimoramento de biossensores para diagnóstico de doenças e monitoramento de intoxicações é alvo de várias pesquisas de diferentes áreas da ciência. Dos vários métodos existentes de detecção, como sensores ópticos ou térmicos, os do tipo eletroquímicos mostraram-se mais relevante nos últimos anos, pois são relativamente baratos de se produzirem, simples de se manusearem e conseguem detectar uma ampla gama de analitos (JUSTINO *et al.*, 2017).

## 1.3 Grafeno

O grafeno é uma estrutura cristalina de carbono na forma de uma folha bidimensional com um átomo de espessura, organizado como uma rede hexagonal onde cada átomo de carbono forma cada vértice, como várias estruturas aromáticas em um plano infinito (HESS, 2013). Andre Geim e

---

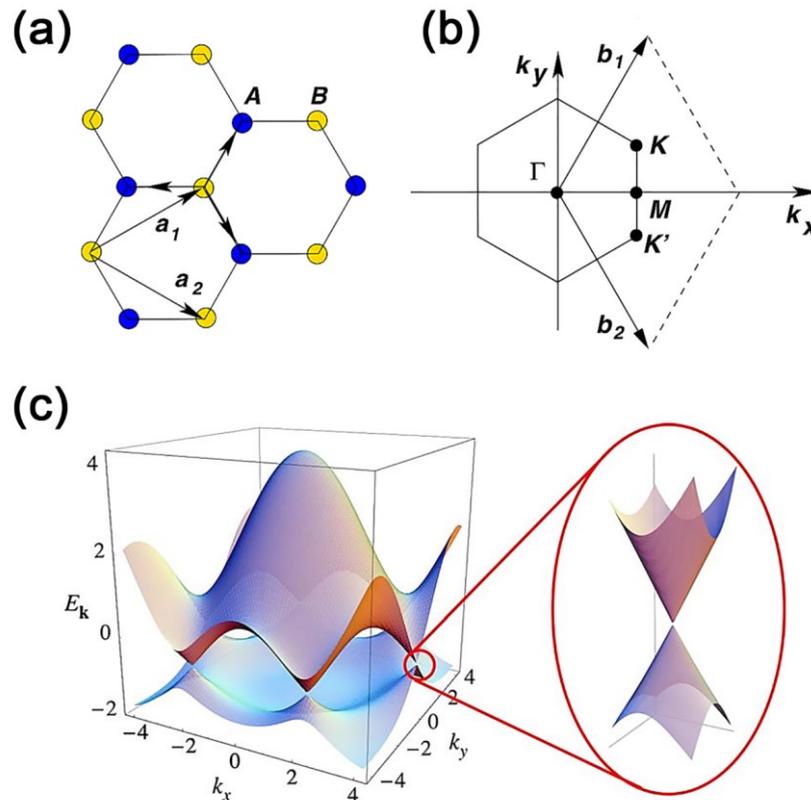
Konstantin Novoselov, em 2004, isolaram pela primeira vez o grafeno, recebendo em 2010 o prêmio Nobel devido suas contribuições a ciência com os experimentos realizados neste material (CASTRO NETO *et al.*, 2009).

O grafeno possui propriedades que o tornam muito importante, como sua alta resiliência a estresse mecânico, sendo 200 vezes mais forte que o aço, além de ser um bom condutor de eletricidade. A flexibilidade estrutural do grafeno reflete-se em suas propriedades eletrônicas (ABERGEL *et al.*, 2010; PERES, 2009).

Os átomos de carbono no grafeno possuem três orbitais planares  $sp^2$  formados pela hibridização dos orbitais  $s$ ,  $p_x$  e  $p_y$  do carbono, que se orientam no plano formando ângulos de  $120^\circ$  entre eles. Na estrutura cristalina, os orbitais  $sp^2$  de cada átomo de carbono distinto se hibridizam formando as ligações  $\sigma$ , responsáveis pela estabilidade estrutural e mecânica do grafeno (ABERGEL *et al.*, 2010; CASTRO NETO *et al.*, 2009). A hibridização  $sp^2$  induz a um arcabouço trigonal planar que pode ser vista com uma rede de Bravais hexagonal ou triangular, com vetores primitivos  $\mathbf{a}_1$  e  $\mathbf{a}_2$  e uma base com dois átomos A e B (Figura 3 a). A célula unitária recíproca, também conhecida como zona de Brillouin, apresenta os pontos  $\Gamma$ , K e M com alta simetria e onde K e K' são conhecidos como pontos de Dirac (Figura 3 b).

O quarto elétron de valência restante do carbono no grafeno ocupa o orbital  $p_z$ , perpendicular ao plano, e se hibridizam com outros orbitais formando as ligações  $\pi$  deslocalizadas, que se hibridizam ao longo de toda a molécula, formando as bandas de valência e de condução do grafeno (REICH; THOMEN; MAULTZSCH, 2004). Essas bandas de valência e de condução se tocam justamente nos pontos de Dirac, onde o nível de Fermi está localizado, tornando o grafeno como um material semiconductor de *gap* nulo, como visto na Figura 3 (c), possuindo densidade de estados nula na energia de Fermi (CASTRO NETO *et al.*, 2009; NOVOSELOV *et al.*, 2005). Na vizinhança dos pontos de Dirac a dispersão de energia apresenta forma cônica, ou linear se visto em

duas dimensões, assim, é importante notar que as características do transporte de elétrons no grafeno são influenciada diretamente pelo caráter nas adjacências dos pontos de Dirac (PERES, 2010).



**Figura 3** – Estrutura hexagonal do grafeno. Em (a) rede cristalina hexagonal do grafeno mostrando os vetores unitários da rede ( $a_1$  e  $a_2$ ). (b) A zona de Brillouin exibindo os pontos de alta simetria  $\Gamma$ , K e M e os pontos de Dirac (K e K'). (c) Estrutura de bandas tridimensional do grafeno, à direita em destaque encontro das bandas de energia em torno de um dos pontos de Dirac. **Fonte:** Adaptado de CASTRO-NEVES *et al.*, 2009.

Entre as banda de valência e condução está o nível de Fermi, que é o potencial eletroquímico total para um elétron e pode ser compreendido, como o valor de energia do último nível ocupado que os estados abaixo desta energia estão completamente ocupados e acima dela estão completamente desocupados (RISTEIN *et al.*, 2010). O grafeno é definido como um semicondutor de *gap* nulo, ou seja, não possui banda proibida, pois as bandas de valência e condutância são simétricas e se encontram no ponto de Dirac, que pode ser chamado de ponto de neutralidade de cargas (CNP - *Charge Neutral Point*), e é exatamente onde passa o nível de Fermi quando a temperatura é 0 Kelvin. (SUZUKI, 2013).

---

As propriedades eletrônicas de um material podem ser moduladas por intermédio de aplicação de um potencial elétrico externo. O grafeno exibe um efeito de campo elétrico ambipolar quando é disposto na forma de um transistor de efeito de campo. Assim, há a indução de portadores de carga quando se aplica uma tensão moduladora, chamado de potencial de porta ou *gate*. Se houver um pequeno *gap* entre as bandas, então o fluxo de elétrons da banda de valência para a de condução só é possível se uma energia externa (e.g. térmica) for fornecida.

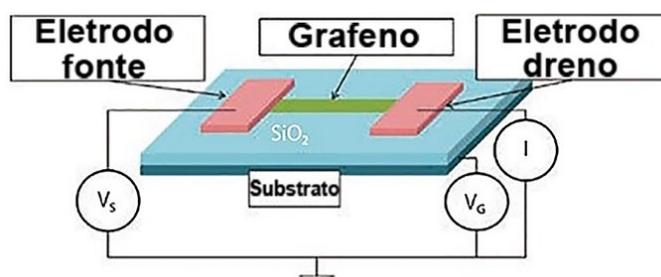
### 1.3.1 *Transistor de Efeito de Campo de grafeno*

Um dispositivo contendo um semicondutor para modular um sinal elétrico é chamado de transistor, dentre os tipos que existem, neste trabalho foi utilizado um transistor de efeito-de-campo (*Field Effect Transistor* - FET). O transistor de efeito de campo é constituído por três terminais, sendo uma porta, uma fonte e um dreno. Este transistor é controlado pela tensão elétrica, essa tensão quando colocada na porta faz com que uma corrente elétrica flua da fonte para o dreno do transistor. Os transistores de efeito de campo possuem uma impedância de entrada muito alta e isso faz com que tenham muito pouca corrente correndo através deles. Assim, o FET busca pouca corrente da fonte de alimentação em um circuito. Isto é ideal porque não perturbam os elementos de potência do circuito original aos quais estão ligados. Um FET é capaz de controlar o fluxo de elétrons ou buracos que atravessam o semicondutor vindos da fonte até o dreno. Ele utiliza uma tensão de porta para afetar essa corrente modificando o tamanho e a forma desse canal condutor, que é o caminho através do qual os elétrons fluem da fonte para o dreno (HALKIAS; MILLMAN; JIT, 2010).

Um transistor de efeito de campo que utiliza grafeno como o semicondutor leva o nome de GFET (*Graphene Field-Effect Transistor*) e é composto por um canal de grafeno entre dois eletrodos com um contato de *gate* para modular a resposta eletrônica do canal, como visualizado na Figura 4. Os GFET exibem uma curva ambipolar sob efeito de um campo elétrico. Sua condutividade é

acionada por portadores de cargas (buracos e elétrons) no canal de grafeno. A condutância do grafeno é proporcional à densidade dos transportadores de carga e sua mobilidade (SELVARAJAN; HAMZAH; MAJLIS, 2017). A adsorção de proteínas pode induzir mecanismos de resposta por dopagem molecular, ou espalhamento dos portadores de carga. Como o grafeno normalmente fica exposto para permitir sua funcionalização de superfície com a ligação de moléculas receptoras à superfície do canal, a ligação de uma molécula alvo ao receptor na superfície do grafeno, gera uma redistribuição das cargas e uma alteração no campo elétrico na região do canal FET, a qual altera a condutividade eletrônica do grafeno e a resposta do dispositivo (KHATAYEVICH *et al.*, 2014; MATSUMOTO *et al.*, 2014).

A transferência de cargas em uma solução desempenha um papel fundamental nos estudos das reações químicas e biológicas. A área da ciência que realiza o estudo desses eventos é a eletroquímica. São estudados processos eletroquímicos facilmente reversíveis onde a troca de elétrons não cause uma desnaturação da biomolécula (STRAKOSAS; BONGO; OWENS, 2015).



**Figura 4** – Arquitetura básica de um GFET. O grafeno em uma placa de silício é utilizado como canal de transistor. Cada transistor é composto por três terminais: eletrodos metálicos de fonte e dreno e um portão. **Fonte:** <http://www.graphene-info.com/>

## 1.4 Eletroquímica

As reações químicas e biológicas são baseadas fundamentalmente na transferência de cargas e uma das áreas da ciência que realizam o estudo desses eventos é a eletroquímica. O sensor

---

eletroquímico geralmente contém três eletrodos: um eletrodo de referência, um eletrodo de trabalho e um contra-eletrodo (BARD; FAULKNER, 2001). O analito que se quer detectar está envolvido em algum tipo de reação que ocorre na superfície do eletrodo, como por exemplo uma ligação com anticorpo, e isso causa uma diferença de potencial através da interface. A corrente elétrica é medida em relação a um potencial fixo e pode ser associado um valor de corrente proporcional à concentração do analito (STRAKOSAS; BONGO; OWENS, 2015).

#### 1.4.1 Comprimento de Debye

Uma dupla camada elétrica se forma todas as vezes que condutores ou semicondutores diferentes são colocados em contato. Quando esse contato ocorre entre um condutor eletrônico (metal ou semiconductor) e um condutor iônico (solução ou óxido) há a formação de um eletrodo. A dupla camada elétrica (do inglês *electrical double layer*) é originada da separação de cargas na interface e devido à separação de cargas, se forma uma diferença de potencial entre o metal e o eletrólito na interface (BARD; FAULKNER, 2001). A dupla camada de cargas na superfície do eletrodo e dos íons da solução podem ser entendidas como um capacitor de placas paralelas (STRAKOSAS; BONGO; OWENS, 2015). Quando a carga no eletrodo é muito pequena, a primeira camada da solução em contato com o eletrodo possui uma quantidade de contra-íons muito maior que a requerida para contrabalancear as cargas contrárias. Porém, a segunda camada compensa as cargas de sinal oposto e essa alternância de cargas se estende, decaindo ao longo de várias camadas em que o potencial eletrostático irá decair linearmente através da interface. O tamanho dessas alternâncias é determinado pela distância média entre os íons (Figura 5) (FEDOROV; KORNYSHEV, 2008).

O comprimento de Debye ( $\lambda_D$ ) é entendido como a distância sobre a qual uma carga  $Q$  é blindada pelos íons em uma solução. Na Figura 5 é possível ver que o excesso de cargas iônicas dentro de esfera de raio  $\lambda_D$  é aproximadamente igual à carga  $-Q$ , cancelando assim o campo  $+Q$  da

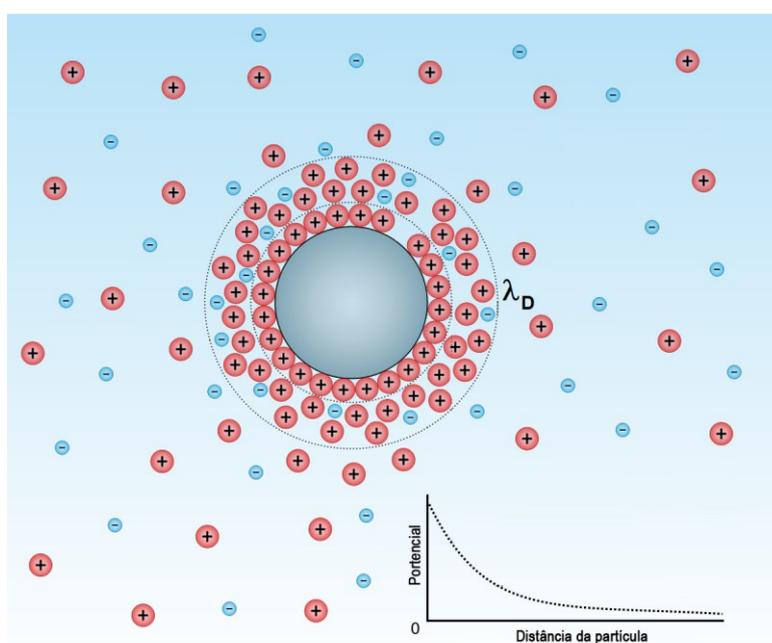
carga original a distâncias superiores a  $\lambda_D$ . Se a esfera central tem uma carga e ela é  $-Q$ , isso fará com que íons positivos sejam atraídos em direção à esfera e íons negativos sejam repelidos, deixando um excesso de cargas negativas (BARD; FAULKNER, 2001).

Para saber a quantidade de cargas que definem o comprimento de Debye, são necessárias as concentrações de íons positivos e negativos dentro da esfera e o volume da mesma, assumindo que todos os íons se distribuem de forma igual e que os portadores de cargas são pontuais. Com isso, considerando  $I$  a força iônica, temos:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad \text{Eq. 1}$$

Onde  $z_i$  é a carga de um íon  $i$  e  $c_i$  é a concentração. Usando a constante de Avogadro ( $N_A = 6,02 \times 10^{23}$  moléculas/mol), a equação para se determinar o comprimento de Debye pode ser aproximada para (OUELLETTE, 2008):

$$\lambda_D \approx \frac{0,3 \text{ nm}}{\sqrt{I}} \quad \text{Eq. 2}$$



**Figura 5** – Representação esquemática do comprimento de Debye e sua influência na detecção de biomoléculas. No centro da figura está uma esfera carregada negativamente e cargas livres com sinal oposto são atraídas em sua direção. O potencial formado pelas cargas diminui com a distância. **Fonte:** Adaptado de WOJCIK, 2012.

---

O comprimento de Debye desempenha um importante papel em diversos ramos da física, entre elas estão a física de plasma, eletrólitos e coloides. Em todas essas áreas de estudo, o comprimento de Debye fornece a medida da distância na qual a influência de um campo elétrico é sentida em uma determinada região, ou seja, é a distância média de penetração do campo elétrico (OUELLETTE, 2008). Este entendimento pode ser extrapolado para um plano bidimensional, para melhor visualização.

Neste trabalho, o comprimento de Debye desempenha um papel de extrema relevância, pois as reações químicas e biológicas devem ocorrer dentro deste comprimento. Se o evento de reconhecimento da ligação anticorpo-antígeno ocorrer dentro da região do comprimento de Debye, o arranjo de cargas na superfície do grafeno, ou seja, cargas do capacitor grafeno/solução, se modifica. Esta modificação de cargas adsorvidas no grafeno muda suas propriedades (MATSUMOTO *et al.*, 2014). Qualquer reação que ocorra fora deste limite sofre uma blindagem ou mascaramento. As interações entre biomoléculas e o grafeno alteram as cargas nos GFETs por intermédio de modificações na concentração de portadores, causadas tanto pelo bloqueio eletrostático ou pelo efeito de dopagem de carga no canal de grafeno.

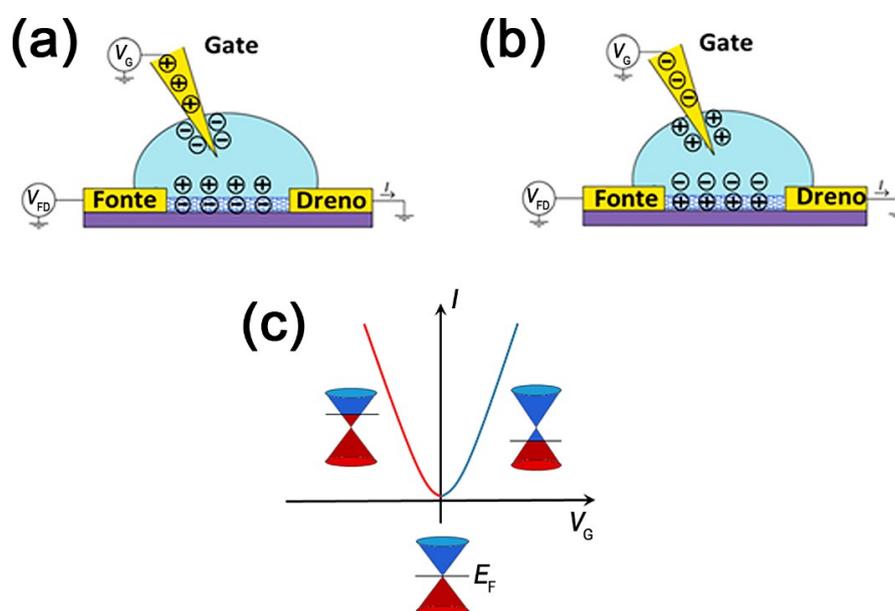
#### **1.4.2 Gate Eletroquímico**

Pode-se modificar as cargas no grafeno mudando sua dopagem intrínseca ou extrinsecamente, ou seja, modulando o nível de Fermi ou o ponto de neutralidade de cargas (ponto de Dirac ou CNP) (JUSTINO *et al.*, 2017).

Quando uma tensão de *gate* ( $V_G$ ) é aplicada no dispositivo, cargas são induzidas sobre a interface grafeno/solução. O grafeno possui um efeito de campo elétrico ambipolar quando na configuração de um transistor de efeito de campo. Ao se aplicar tensão negativa no eletrodo de *gate*

( $V_G$ ) há a indução de uma grande concentração de carga do tipo buracos no canal de condução (Figura 6 a), enquanto ao se aplicar um  $V_G$  positivo um grande número de elétrons é induzido (Figura 6 b).

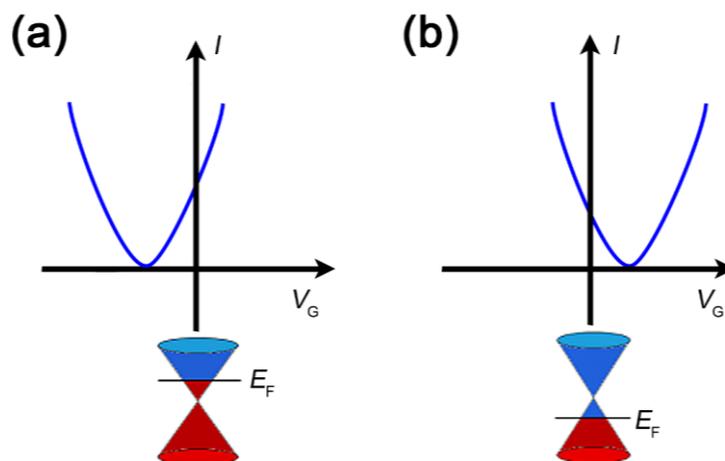
Alterando o número de portadores de carga modifica-se o nível de Fermi ( $E_F$ ). Em um grafeno não dopado, a curva de corrente em função de  $V_G$  forma uma hipérbole, com o CNP no valor de  $V_G = 0$ , a isto dá-se o nome de dopagem eletrostática do material (Figura 6 c). Ao se aplicar um  $V_G$  positivo, cargas negativas são induzidas no grafeno e, conseqüentemente, o nível de Fermi será deslocado para acima do ponto de Dirac, pois há agora excesso de cargas negativas (elétrons), uma dopagem tipo- $n$ . De forma semelhante, ao se aplicar um  $V_G$  negativo, cargas positivas são induzidas no grafeno e, conseqüentemente, o nível de Fermi será deslocado para abaixo do ponto de Dirac, pelo excesso de cargas positivas (buracos), uma dopagem tipo- $p$  (Figura 6 c) (GUO, BEIDOU *et al.*, 2011; NOVOSELOV *et al.*, 2005).



**Figura 6** – Curva de  $I_{FD} \times V_G$  para o grafeno não dopado ao se aplicar uma tensão de *gate*. Quando há um excesso de buracos, o nível de Fermi estará abaixo do ponto de Dirac (a). Assim, para elevar o nível de Fermi ao ponto Dirac, deve-se injetar elétrons ao grafeno, com um potencial de *gate* positivo, dopando tipo- $n$  o grafeno (b). Com isso, o nível de energia de Fermi passará pelo ponto de Dirac e entrará no cone superior e agora há excesso de elétrons, dopagem tipo- $p$  do grafeno, em (c) - Vermelho representa elétrons e azul buracos. **Fonte:** Adaptado de OUELLETTE, 2008.

O comportamento de GFETs pode ser avaliado através da curva  $I_{FD} \times V_G$ , que é obtida pela corrente  $I_{FD}$  ( $F$  de fonte e  $D$  de dreno) que flui entre o eletrodo de fonte e dreno em função da tensão de *gate* ( $V_G$ ) aplicada sob uma tensão fixa entre eletrodo de fonte e dreno,  $V_{FD}$  (abreviação de  $F$  para *fonte* e  $D$  para *dreno*), conforme exemplificado na Figura 6 (c).

Uma característica importante a respeito das curvas de condutividade do grafeno é o deslocamento horizontal de toda a curva e do ponto de neutralidade, ponto de menor valor de condutividade. Seu deslocamento indicam uma mudança na dopagem devido a transferência de cargas ao grafeno (CASTRO NETO *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2010). Essa dopagem pode ser intrínseca, pela adição de heteroátomos à estrutura cristalina do grafeno, ou extrínseca pela adsorção de alguma molécula à sua superfície, fazendo algum tipo de interação intermolecular forte com os átomos de carbono do grafeno (Figura 7) (GUO, BEIDOU *et al.*, 2011). É importante notar que a dopagem extrínseca do grafeno pode ser causada por diversos fatores externos, sendo intencionais ou não. É muito comum em dispositivos de grafeno ocorrer uma dopagem extrínseca quando esses são expostos ao ambiente por um período muito longo de tempo que adiciona moléculas de água ao filme de grafeno (SHIM *et al.*, 2012).



**Figura 7** – Curvas de *gate* do grafeno para dopagem extrínseca tipo- $n$  e tipo- $p$ . Em (a), o grafeno intrinsecamente dopado com excesso de elétrons,  $V_G = 0$ ,  $E_F$  está acima do ponto de Dirac. Em (b), o grafeno intrinsecamente dopado com excesso de buracos,  $V_G = 0$ ,  $E_F$  está abaixo do ponto de Dirac. **Fonte:** Adaptado de MEIRELES, 2016.

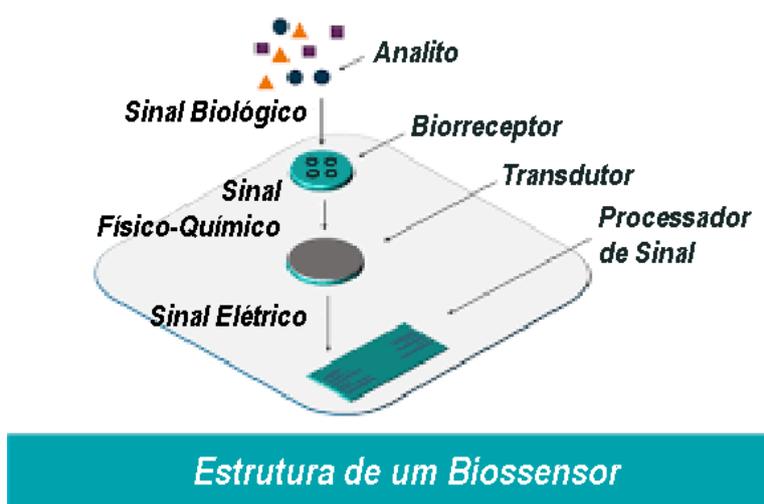
O deslocamento da curva  $V_G \times I_{FD}$  pode ser visualizado com os cones de Dirac (abaixo das curvas de transferência). Quando  $E_F$  atinge o ponto de Dirac, onde a energia em que a banda de condução e de valência se encontram, a condutividade do grafeno possui seu valor mínimo. A tensão  $V_{FD}$  relativa a qual isto acontece é chamada de tensão de Dirac ( $V_{Dirac}$ ). Quando a  $E_F$  está abaixo de  $V_{Dirac}$ , a maior parte dos portadores de carga na banda de valência do grafeno são buracos. Quando se diminui ainda mais  $V_G$  o nível de Fermi é deslocado mais ainda para o interior da banda de valência, e a densidade de carga aumenta (Figura 7 a), gerando uma corrente. Quando  $E_F$  é deslocado acima de  $V_{Dirac}$ , a condutividade é devida aos elétrons na banda de condução do grafeno, cuja a densidade de cargas pode ser modulada similarmente a anterior (Figura 7 b).

É possível, dessa forma, utilizar os efeitos de transferência de carga direta entre biomoléculas adsorvidas ao grafeno de GFETs para o sensoriamento do analito em questão. Muitas moléculas interagem fortemente com o grafeno e tais interações amplificam o efeito de transferência de cargas, visualizado através de mudanças de  $V_{Dirac}$  e também na alteração na condutância do canal de grafeno consequentemente permitindo que essas possam ser detectadas eletricamente (DANKERL *et al.*, 2010). Esse efeito também é observado através da adsorção de proteínas sobre o grafeno e já elucidado em FETs a base de nanotubos de carbono (ABERGEL *et al.*, 2010).

## 1.5 Grafeno como biossensor

Os biossensores são caracterizados como dispositivos associados às funções de detecção tanto qualitativa quanto quantitativa de substâncias ou biomoléculas. Compõem um biossensor um elemento ativo de sensoriamento e um transdutor de sinais, sejam eles elétricos, ópticos, térmicos ou magnéticos. Por conseguinte, um analito qualquer é detectado por interações físico-químicas por algum biorreceptor que exerce a função de ligar-se seletivamente a uma biomolécula enquanto o transdutor converte a ocorrência do evento específico em um sinal capaz de ser lido por um

processador deste sinal (TURNER, 1987). Uma ilustração geral de um biossensor mostra como os elementos sensitivos desempenham o papel de detecção seletiva de seus respectivos materiais biológicos na Figura 8.



**Figura 8** – Estrutura de biossensor genérico, mostrando que o analito é reconhecido por um e um transdutor o transforma em um sinal elétrico. **Fonte:** <https://www.surfix.nl/applications/biosensors>.

O grafeno para aplicações como sensores biológicos tem recebido considerável atenção devido às suas propriedades físico-químicas únicas, tais como grande relação superfície-volume, alta resistência mecânica, biocompatibilidade, excelente condutividade elétrica, baixo custo e facilidade de produção. O grafeno também exibe um amplo potencial eletroquímico tornando-o ideal para sensores rápidos multifuncionais, podendo ser aperfeiçoados para se tornarem práticos e precisos. Outra característica importante requerida nos biossensores é a capacidade de ser funcionalizada, e tanto o grafeno como o óxido de grafeno (GO) são materiais versáteis para a funcionalização (ABERGEL *et al.*, 2010; SCHWIERZ, 2010).

Esta multiplicidade de propriedades favoráveis levou a uma vasta gama de investigações sobre o uso de grafeno para a biossensibilidade. Configurações particularmente interessantes são transistores de efeito de campo de grafeno (GFET) e ressonância de plásmon de superfície

---

amplificada com grafeno (SPR). Estes tipos de sensores de grafeno têm sido utilizados para detecção de DNA, proteínas, glicose e bactérias (PUMERA, 2011).

Essas qualidades do grafeno o colocam como plataforma única na criação de dispositivos de teste clínico do tipo *point-of-care* ou testes rápidos. O teste tipo *point-of-care* permite o diagnóstico de pacientes ainda no consultório médico, em uma ambulância, em casa ou mesmo no campo. O início de um tratamento pode ser imediato e permitem maior praticidade tanto ao paciente quanto ao médico e que se possa tomar decisões no ponto de atendimento tem o potencial de impactar significativamente a prestação de cuidados de saúde e enfrentar os desafios das disparidades de saúde (BOYD; WOOLLEY, 2016).

A realização deste trabalho aqui proposto se justifica pela escassez de informações sobre os sensores efetivos da exposição a aflatoxina B<sub>1</sub> e pela dificuldade de diagnóstico precoce dos danos causados pela exposição, dada a ausência de biomarcadores que possibilitem esse diagnóstico.

Este trabalho está inserido no projeto de pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E DE EFEITO PARA AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS DA UTILIZAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE A SAÚDE DE TRABALHADORES RURAIS”, nº 17217.9850001/12-025 do Ministério da Saúde.

## 2 OBJETIVOS

---

O presente trabalho tem como objetivo central desenvolver de biossensor miniaturizado do tipo GFET para a detecção ultra-sensível e seletiva de biomarcador de exposição da intoxicação de aflatoxina B<sub>1</sub>.

### 2.1 Objetivos específicos:

Para alcançar o objetivo central desta tese, foram estipuladas as seguintes metas:

- a) Montar uma plataforma de uma monocamada de grafeno para a ancoragem de proteínas em sua superfície em lâminas de Si/SiO<sub>2</sub>;
- b) Aperfeiçoar a metodologia existente baseada em transistores de efeito de campo de grafeno para a detecção da interação proteína-ligante e proteína-anticorpo;
- c) Imobilizar ao grafeno anticorpos específicos para a discriminação de AFB<sub>1</sub>, seguida da detecção dos biomarcadores;
- d) Construir um dispositivo do tipo *point-of-care* como metodologia rápida e eficaz para a detecção de AFB<sub>1</sub>, que envolva detecção específica por anticorpos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

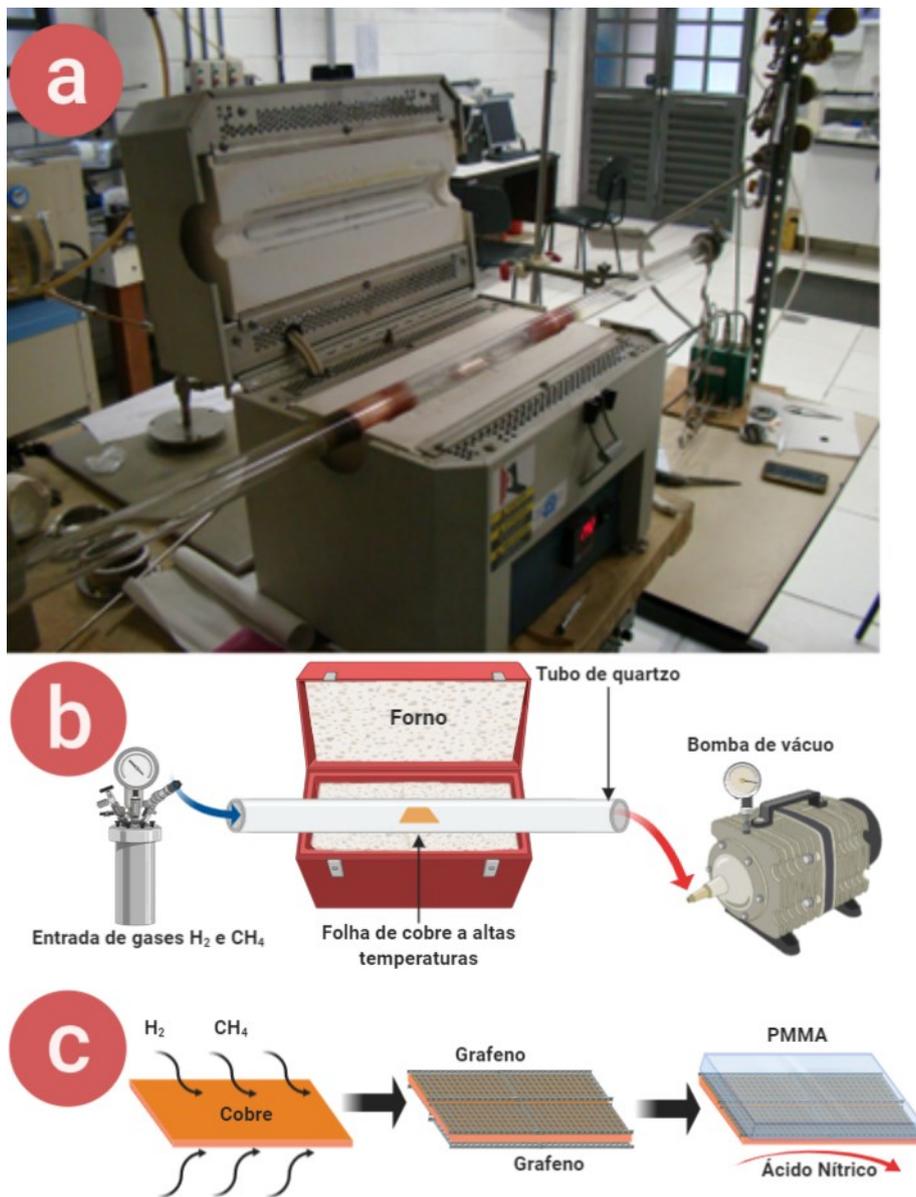
---

O grafeno pode ser obtido a partir de exfoliação de grafite ou por deposição química, o que incluem diversos métodos com uma ampla abrangência de custos e eficiência (ZHONG *et al.*, 2015). A obtenção de grafeno utilizado neste trabalho foi a partir de método já estabelecido no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG, por deposição química na fase vapor (CVD, *chemical vapor deposition*) (EDWARDS; COLEMAN, 2013; LI *et al.*, 2009; MEIRELES, 2016). O método CVD possui a característica de ser relativamente barato, altamente reprodutível e produz grafeno em grandes áreas (WOJCIK, 2012).

#### 3.1 Obtenção do grafeno CVD

O sistema utilizado para o crescimento foi composto por controladores de fluxo de gases, um forno com o sustentáculo para um tubo de quartzo capaz de suportar altas temperaturas em ambiente de vácuo, como visto na Figura 9 a e b. Neste processo, o grafeno é chamado de CVD (*Chemical Vapor Deposition*) (EDWARDS; COLEMAN, 2013; LI *et al.*, 2009). A primeira etapa consistiu em preparar uma lâmina de cobre policristalino como substrato para o crescimento do grafeno, com as dimensões  $8 \times 2$  cm ou, em um forno maior, de  $15 \times 10$  cm. Em seguida, foi lavada em banho de ácido acético, por 1 h, para a remoção de quaisquer resíduos de óxido de cobre na superfície da folha. Uma lâmina de cobre de  $5 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$  foi lavada em banho com água deionizada, seca com  $\text{N}_2$  e introduzida no centro do tubo de quartzo. Com auxílio de controladora de pressão, foi ajustado no interior do tubo o fluxo de uma mistura de  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_4$ , e pressão base de  $10^{-5}$  Torr. O crescimento teve um tempo médio de 4 h a uma temperatura máxima de  $1.000 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ao final, a lâmina de cobre possui um filme de grafeno que reveste ambas as suas superfícies. Cobrimos umas das faces da lâmina Cu/grafeno com polimetilmetacrilato (PMMA) com espessura de 250 nm por método de *spin coating*.

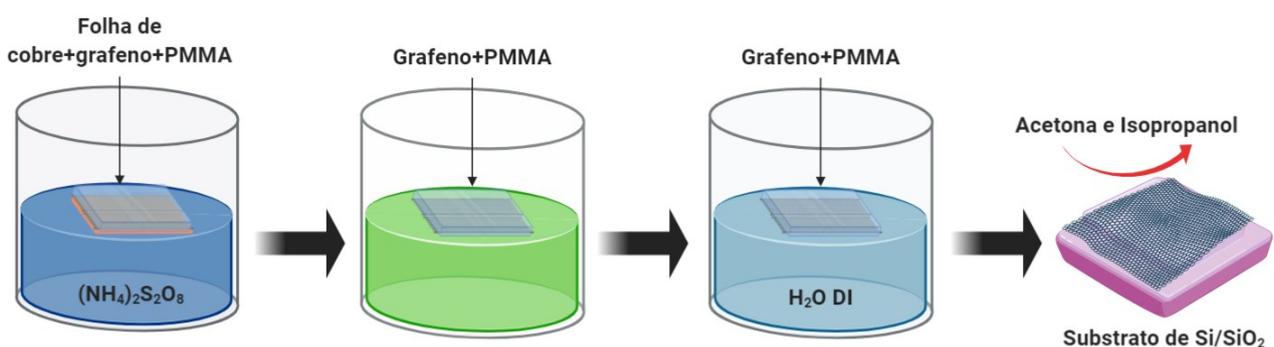
A lâmina foi aquecida a 110 °C por 10 min em chapa de aquecimento para estabilização mecânica da estrutura, em seguida a lâmina foi colocada em banho de ácido nítrico para corrosão do carbono da face não coberta e depois em água deionizada para remoção do excesso de ácido nítrico (Figura 9 c).



**Figura 9** – Em (a), fotografia do forno e tubo de quartzo para crescimento do grafeno. Em (b) esquema de parte do sistema de produção de grafeno CVD no Laboratório de Nanomaterias da UFMG, ilustrando a entrada de H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, forno com tubo de quartzo e bomba de vácuo e em (c) esquema a preparação do cobre para transferência do grafeno. **Fotografia:** Gustavo Arrighi Ferrari.

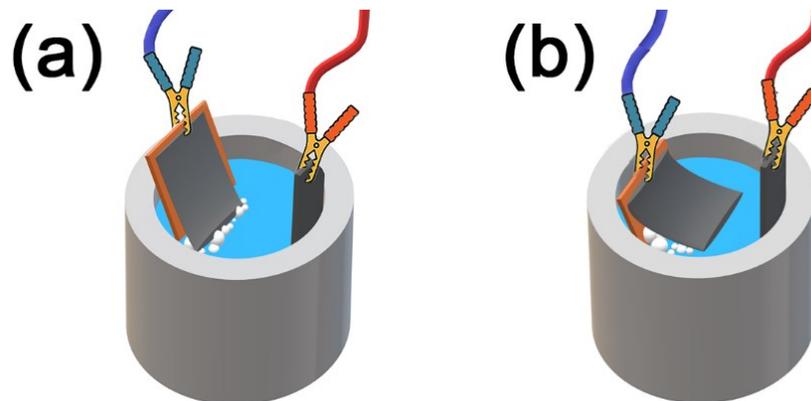
### 3.2 Transferência de grafeno para chip de Si/SiO<sub>2</sub>

A transferência de grafeno para seu substrato de trabalho foi realizada de duas maneiras distintas. Inicialmente, utilizamos método de transferência úmida (KIM *et al.*, 2009). Colocamos o cobre na superfície de uma solução de persulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) em uma concentração de 0,1 mol/L por 24 horas. Após este tempo, o cobre foi completamente removido, ficando apenas uma película de grafeno/PMMA flutuando na solução. Com o auxílio de uma pinça, utilizamos um substrato de Si/SiO<sub>2</sub> para pescar o filme grafeno/PMMA e o filme com grafeno/PMMA transferido rapidamente para sucessivos banhos de água deionizada por 30 min cada. Na última etapa, o substrato final foi utilizado para a última pesca e o filme grafeno/PMMA mantido em ambiente limpo até que toda a água fosse evaporada. Previamente à deposição do grafeno/PMMA, os substratos foram limpos em ambiente de sala limpa, com subsequentes banhos de acetona e isopropanol e secos com jato seco de N<sub>2</sub>. O PMMA foi retirado da parte de cima do grafeno mergulhando o substrato, já com o grafeno definitivamente aderido a esse, em acetona por 24 horas, depois em isopropanol por 30 minutos e seco com jato de N<sub>2</sub> (Figura 10).



**Figura 10** – Esquema sequencial do processo de transferência úmida do grafeno para um substrato. O grafeno foi crescido sobre lâminas de cobre e uma camada de PMMA depositada sobre o grafeno e em seguida feita a corrosão da lâmina em persulfato de amônia, acompanhada de passagens em água para lavagem do grafeno. O PMMA foi posteriormente retirado com acetona quando o grafeno já estava fixado ao substrato final. **Fonte:** Próprio autor.

Um método de transferência eletroquímica para se retirar o grafeno da folha de cobre passou a ser utilizado posteriormente (SUN *et al.*, 2016). Em um sistema contendo solução de 0,25 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH), um potencial elétrico foi aplicado com o cátodo sendo uma barra de platina metálica e o ânodo na lâmina de cobre com grafeno, a corrente foi fixada em 1 A. Após isso, inserimos lentamente a lâmina na solução e o grafeno é removido à medida que o cobre encosta na solução de NaOH. O processo eletroquímico com hidróxido causa à medida que a folha de cobre encosta na solução a geração de H<sub>2</sub>, formando bolhas que penetram na interface Cu/grafeno e separando mecanicamente os dois (Figura 11 a). Ao final do processo, um filme de grafeno com PMMA livre do cobre é obtida flutuando sobre a solução básica, isso em apenas poucos minutos (Figura 11 b). Com o auxílio de uma tira de politereftalato de etileno (PET), o filme grafeno/PMMA foi transferido para sucessivos banhos de água deionizada por 30 min cada. Na última etapa, utilizamos o substrato final uma lâmina de Si/SiO<sub>2</sub> limpa de acordo com método anterior para a última pesca e o filme grafeno/PMMA foi mantido em ambiente limpo até que toda a água fosse evaporada.

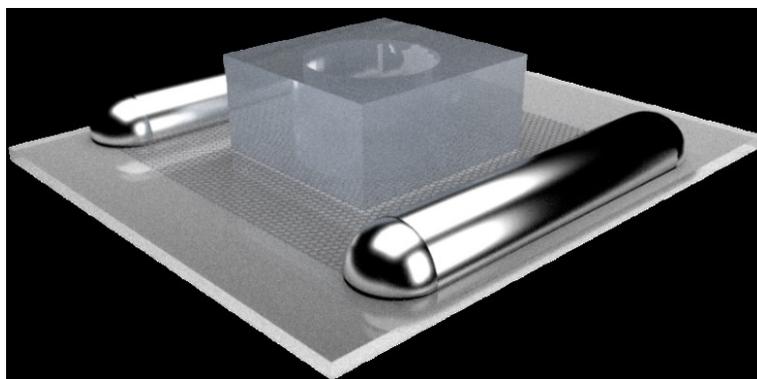


**Figura 11** – Esquema do processo de transferência eletroquímica com formação de bolhas de H<sub>2</sub> na solução alcalina. O grampo azul representa o ânodo, constituído pela lâmina de cobre e o grampo vermelho é o cátodo a barra de platina. **Fonte:** Próprio autor.

Nesse sistema de transferência eletroquímica com a lâmina de PET é evitado qualquer permeação de partículas em direção à superfície do grafeno e, como resultado, o dano do grafeno é mitigado e é mais efetivo em termos de tempo e custo.

### 3.3 A arquitetura do dispositivo

Seguindo a literatura da área de GFETs, construímos um primeiro modelo de dispositivo, para fim de familiarização com um biossensor de grafeno, com longas fitas de grafeno e funcionalizadas em uma arquitetura de piscina (PUMERA, 2011). Este modelo adotado possuía uma grande área superficial, o que implicava em um maior número de defeitos na malha de grafeno e, conseqüentemente, em uma medida mais ruidosa. A arquitetura simples deste modelo de dispositivo constituía-se de uma camada de grafeno CVD sobre uma lâmina de vidro e um pequeno pedaço de polidimetilsiloxano (PDMS) com uma abertura central delimitando o espaço onde os testes deveriam ocorrer (Figura 12). Contatos de tinta prata foram construídos em ambas as extremidades do grafeno e a eles fixados fios de cobre para contato com o sistema de medição. Todos os processos de medição e funcionalização ocorriam no interior da piscina de PDMS, sem cobertura do restante do grafeno exposto.



**Figura 12** – Arquitetura inicial do dispositivo simples Dispositivo simples com PDMS delimitando região com líquido e amostra a serem testados e contatos de prata nas extremidades do filme de grafeno.  
**Fonte:** Próprio autor.

### 3.3.1 *Arquitetura com contatos metálicos por fotolitografia e caracterização por microscopia óptica*

Posteriormente, foi adotada uma arquitetura mais sofisticada, contendo um canal de PDMS fechado, com as aberturas unicamente para entrada das soluções da reação e do eletrodo de medição. A área do grafeno foi delimitada por fotolitografia a pequenos retângulos microscópicos sobre contatos de ouro. Os microchips de grafeno foram produzidos no Laboratório de Nanomateriais, cuja tecnologia já é dominada, sendo construídos em uma plataforma de silício/óxido de silício, com a construção dos circuitos de contatos metálicos utilizando técnicas de litografia óptica e adesão do grafeno à placa de silício (MEIRELES, 2016).

O biossensor de grafeno foi desenvolvido para conter 27 contatos de grafeno, divididos em 9 conjuntos de 3 contatos. Cada conjunto possui um dreno comum para 3 fontes distintas, e todo o chip possui a dimensão de 4 cm<sup>2</sup>. O grafeno com PMMA obtido da transferência eletroquímica foi transferido para os substratos finais, pequenos chips de Si/SiO<sub>2</sub>, com as dimensões de 25 × 25 mm. A escolha de substratos finos foi necessária para as condições para utilização de um microscópio invertido. Os substratos possuíam os contatos metálicos de Cr/Au (20/60 nm) fabricados em litografia óptica (Figura 13 a).

A construção do chip com os contatos metálicos foi feita por fotolitografia. Primeiramente, cada chip é composto um pequeno pedaço de Si/SiO<sub>2</sub> com espessura de 300 nm com dimensões 2 × 2 cm e limpo em acetona em ultrassom por 5 min e outros 5 min de ultrassom com isopropanol. Utilizamos o fotorresiste LOR depositado como uma película de 1,0 μm de espessura por *spin-coat* a 3.800 rpm com aceleração 1.000 rpm/s por 45 s. Imediatamente após, o fotorresiste S1813 foi adicionado pelo mesmo processo anterior. O fotorresiste LOR tem a função de providenciar baixos níveis de defeitos em filmes com uma ampla faixa de espessura formados pelos processos de revestimento rotativo (*spin-coat*). Para o processamento de remoção limpa (*lift-off*), o filme de LOR

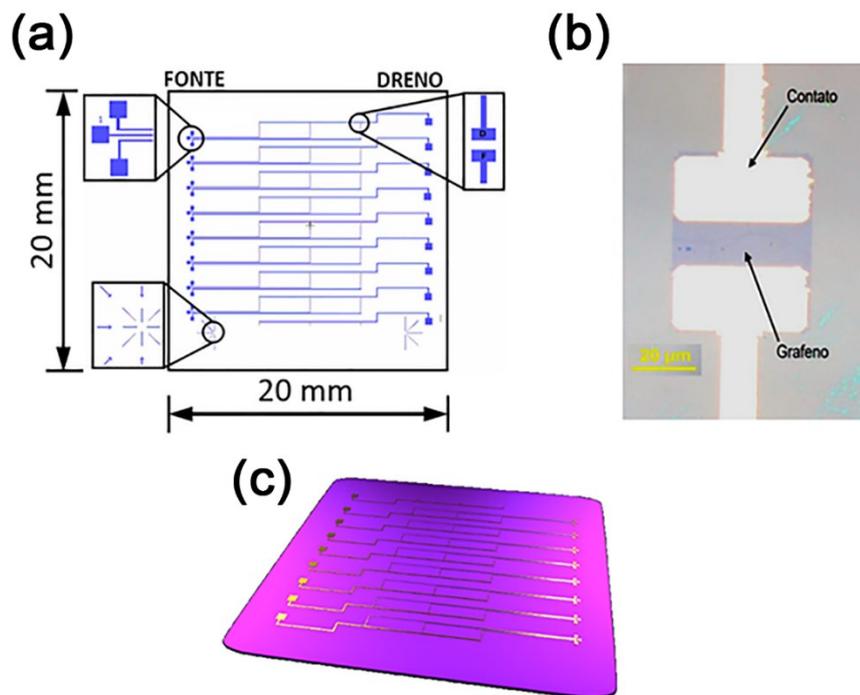
---

deve ser mais espesso que a espessura do metal a ser adicionado (KWANG-SEOK YUN; EUISIK YOON, 2004).

Realizamos um *pré-bake* de 90 s a 100 °C para evaporação do solvente do fotorresiste. Já na foto-alinhadora (Karl Suss MJB 3 da sala-limpa do Departamento de Física da UFMG), a máscara com o padrão das trilhas de contato foi alinhada sobre o substrato e expostas à luz UV (350-500 nm) durante 15 s. Essa máscara serve para proteger as regiões de interesse delimitadas, pois o fotorresiste S1813, por ser positivo, quando é exposto à luz UV torna-se sensibilizado. Isso quer dizer que há rompimento de ligações químicas nas cadeias poliméricas do fotorresiste, tornando-as menores e mais solúveis e facilmente removíveis com a utilização de solvente específico, no caso, com o auxílio de MF26A. Mergulhamos o chip por 18 segundos no removedor e em seguida lavamos com água deionizada e secamos com N<sub>2</sub>. Cada chip foi então preparado para a evaporação térmica em alto vácuo de uma camada constituída de 5 nm de cromo e 35 nm de ouro, sobre todo o substrato. No processamento de remoção limpa, o *lift-off*, os chips foram mergulhas em *N*-metil-2-pirrolidona por 12 h e limpos com acetona e isopropanol, restando apenas as trilhas de Au/Cr delimitadas pela litografia (Figura 13 a).

O chip com as trilhas metálicas foi utilizado como substrato final para pesca do filme de grafeno/PMMA, como elucidado no item 3.2, revestindo todos os contatos metálicos (Figura 13 c). Os chips foram então mergulhados em solução de acetona, para remoção do PMMA e realizamos *spin-coat* do fotorresiste positivo S1813 por 45 segundos a 3.800 rpm e aceleração de 1.000 rpm/s, nessa configuração gera-se um filme de aproximadamente 1,5 µm de espessura distribuído por todo o chip. Logo em seguida fizemos um *soft-bake* de 90 segundos a 100 °C e então a fotolitografia para a produção final dos chips com o grafeno delimitado apenas nas regiões entre os eletrodos de fonte e dreno (Figura 13 b).

Realizamos nova remoção de fotorresiste com MF26A e, após esse processo, o chip fica livre de S1813 sensibilizado, mas com as regiões entre os contatos com grafeno protegido pelo S1813 enrijecido. Todo o restante do filme grafeno foi corroído com a utilização de plasma de  $O_2$  com pressão de 1 Torr em sucessivas etapas de 10 s cada, ao final de cada etapa o chip era observado em microscopia óptica convencional para visualização da corrosão do grafeno exposto. Desta forma, pequenas regiões retangulares de grafeno/S1813 com  $45 W \times 62 L \mu m$  nos contatos de Au/Cr foram protegidas após a revelação, como visto na Figura 13 (b). As análises observacionais por microscopia das lâminas de Si/SiO<sub>2</sub> contendo os contatos de Au/Cr e o grafeno foram realizadas utilizando-se um microscópio óptico convencional Olympus BX51.

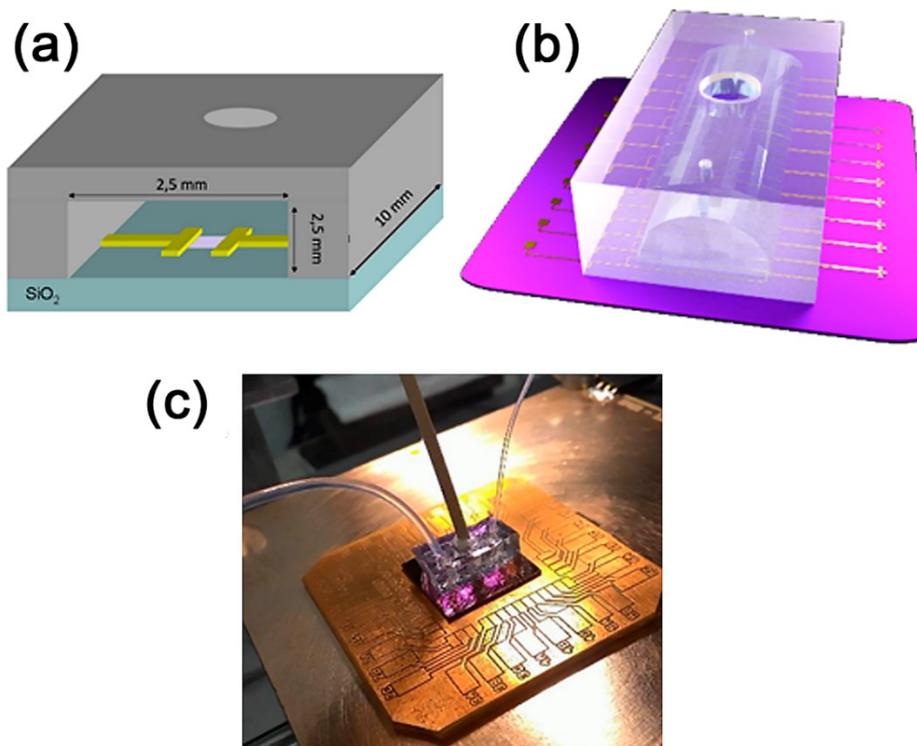


**Figura 13** – Dispositivo com arquitetura mais sofisticada, evidenciado pelo conjunto de contatos de Au/Cr em (a) Fonte: Adaptado de ALMEIDA, 2013. Na microfotografia em (b), é possível visualizar o grafeno sobre os dois terminais do contato Au/Cr. Em (c) um modelo demonstrando o aspecto final do chip. Fonte: Próprio autor.

Ao final do processo, os chips foram imersos em acetona para eliminação do fotorresiste sobre o grafeno. O arcabouço utilizado no sistema foi fabricado em molde de PDMS e consistiu em um

retângulo que cobre a superfície plana do dispositivo. A dimensão deste canal, em geral, era de 10 mm × 2,5 mm × 2,5 mm. No arcabouço desejado fizemos uma abertura na parte superior do PDMS para dar acesso ao eletrodo de referência de Ag/AgCl (Figura 14 a-c).

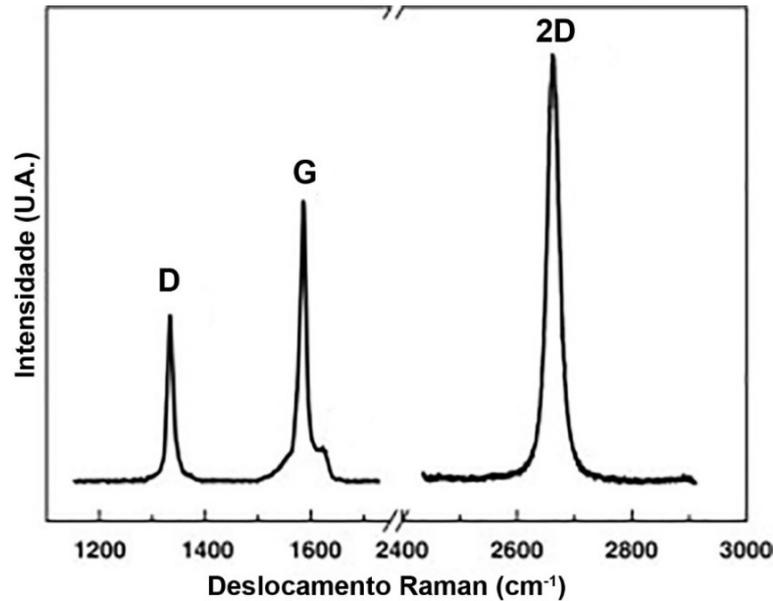
Na entrada do canal de PDMS, uma abertura menor foi utilizada para adicionar as soluções de trabalho do biossensor (Figura 14 b-c). Para a funcionalização do grafeno, utilizamos a albumina sérica humana (HSA), a enzima acetilcolinesterase (AChE) e os anticorpos específicos anti-aflatoxina B<sub>1</sub>. Uma solução de bloqueio foi ainda adicionada para que as regiões do grafeno que ainda estejam expostas sejam inibidas, evitando que moléculas interferentes possam atrapalhar a medida. Os chips contendo os dispositivos foram conectados a um *chip-holder* capaz de ser encaixado por meio de pinos metálicos ao *setup* de medidas, como visto na Figura 14 (c).



**Figura 14** – Dispositivo utilizado nas análises. **(a)** Diagrama em corte do dispositivo com a piscina de PDMS posicionada sobre o dispositivo. **(b)** Ilustração do dispositivo com o arcabouço de PDMS com canal medindo 5 cm de comprimento e 1 cm de largura. **(c)** Foto do dispositivo montado e com eletrodo de Ag/AgCl conectado. **Fonte:** Próprio autor.

### 3.4 Caracterização do grafeno por espectroscopia Raman

Uma das principais técnicas utilizadas na caracterização de compostos de carbono é a espectroscopia de Raman. Esta técnica é capaz de fornecer informações a respeito da estrutura cristalina do grafeno, além do seu número de camadas e a presença de impurezas. A espectroscopia de Raman consiste em um laser focalizado sobre ou pequena porção da amostra que então é espalhado de forma não elástica. Este feixe incidente na amostra excita estados eletrônicos e esses, ao retornarem ao estado inicial, emitem energia com comprimento de onda diferente do laser incidente (FERRARI *et al.*, 2006). No grafeno, o espectro Raman possui três bandas principais, nomeadamente G, D e 2D (Figura 15). A banda G tem um pico central em torno de  $1.580\text{ cm}^{-1}$  e está associada com materiais de carbono por causa da hibridização  $sp^2$ , como o grafeno e o grafite cristalino (MALARD *et al.*, 2009). O pico da banda G não tem variação quanto ao número de camadas de grafeno e não é capaz de permitir a diferenciação do grafeno com uma ou muitas camadas. Porém, contaminantes na estrutura química no grafeno alteram a posição do pico e a banda G pode ser empregada para avaliar a dopagem da amostra (MALARD *et al.*, 2009). A banda D tem pico em  $1.350\text{ cm}^{-1}$  e está associada a defeitos estruturais no grafeno, ou seja, a desordem da estrutura. Grafeno crescidos por método de deposição química usualmente apresentam a banda D evidente porque eles possuem algumas regiões descontínuas.



**Figura 15** – Espectro típico obtido de uma medida por espectroscopia Raman de grafeno mostrando as principais características Raman, as bandas D, G e 2D. **Fonte:** Adaptado de MALARD *et al.*, 2009.

Também é visto na Figura 15 a banda 2D, centrada em  $2700 \text{ cm}^{-1}$ , é a principal banda utilizada para a determinação do número de camadas em amostras de grafeno, visualizada pela largura da mesma. Diferentemente da banda D, a banda 2D não reflete defeitos na rede de carbono, assim, ela é sempre muito proeminente no grafeno, mesmo sem nenhuma banda D presente. Ressalta-se que uma camada única grafeno pode ser identificada analisando-se a razão da intensidade dos picos das bandas 2D e G ( $I_{2D}/I_G$ ). Essa relação em um grafeno monocamada fica em torno de 2 e isso juntamente à falta de uma banda D e uma banda 2D simétrica são frequentemente usadas como confirmação de amostras de grafeno livres de defeitos. Esta banda também é usada quando se tenta determinar a espessura da camada de grafeno (FERRARI *et al.*, 2006; MALARD *et al.*, 2009; POPOV, 2016).

As análises por espectroscopia Raman foram conduzidas utilizando um equipamento Zeiss EC Epiplan-Neofluar equipado com um microscópio óptico confocal com resolução espectral de  $1 \text{ cm}^{-1}$  usando um laser de argônio de  $532 \text{ nm}$  à  $10 \text{ mW}$  e tempo de aquisição de  $10 \text{ s}$  com detector CCD do Laboratório multiusuário do Departamento de Física da UFMG. As análises dos resultados foram feitas pelo programa Witec ProjectFour 4.1.

### 3.5 Caracterização por microscopia de força atômica

Para se visualizar a distribuição a nível manométrico funcionalização e aspecto do grafeno, um ensaio de microscopia de força atômica (AFM) foi realizado em um microscópio Solver-NANO (NT-MDT®) do Laboratório de Nanoscopia (LabNano) do Departamento de Física da UFMG. Foi realizada varredura da topografia em semi-contato (*tapping*) com sondas de silício PPP-FMR50 da marca Nanosensors de uma pequena área de grafeno sensibilizado e não sensibilizado. Os resultados foram analisados pelo programa Gwyddion 2.51.

### 3.6 Caracterização Elétrica

Para realizar as medidas elétricas, utilizamos um sistema contendo um *lock-in* Stanford Research Systems SR830 como fonte de tensão para o *gate* e fonte de tensão para o canal com grafeno, um multímetro Keithley 2400 como leitor da corrente no dreno e um pré-amplificador DL Instruments 1211 para melhorar o sinal de dreno. Os cabos que conectam os equipamentos à caixa de passagem são coaxiais do tipo BNC. Uma caixa de passagem dos cabos BNC foi usada permitindo desligar ou aterrar algum equipamento ou contato. O dispositivo foi acoplado a uma placa de circuito de silício no porta-amostras e este conectado ao sistema de medida através de uma conexão RS-232 de 25 pinos. As medidas elétricas foram controladas através do programa MatLab que maneja e aplica as tensões usando como a interface de comunicação um cabo USB para GPIB (National Instruments®). A grande vantagem do *software* utilizado é a possibilidade de monitorar a resistência da amostra, além dos valores tensão com concomitante visualização dos resultados em tempo real. Para todos os ensaios de monitoramento de pH, detecção de proteína e dos antígenos, aguardava-se um tempo de 10 minutos antes de se iniciar quaisquer as medidas, visando a maior estabilidade da resposta dos biossensores.

---

Para os ensaios de medidas por tempo, permitimos um fluxo contínuo da solução através do canal de fluídica e uma seringa contendo a solução foi posicionada e conectada a um motor de passo que fez a função de bomba. O motor de passos podia ser operado tanto pelo programa Arduino no computador ou por uma caixa com chaves alavancas. Uma mangueira de cateter de silicone fazia a conexão entre a seringa e o sistema de medição. O fluxo foi fixado em 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , observando que na faixa de 10 a 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  os ruídos nas medidas são reduzidos. Estes sistemas foram projetados e confeccionados pelo aluno Vinicius Ornelas, membro do grupo de Nano-materiais.

As medidas elétricas constituíam-se na aplicação de uma tensão  $V_{\text{FD}}$  constante entre os contatos de Au/Cr passando pelo grafeno, de modo a induzir uma corrente  $I_{\text{FD}}$  entre eles, como observado nas Figura 6 e Figura 7. A resistência total obtida da reta de  $V_{\text{FD}} \times I_{\text{FD}}$  é composta pelas resistências dos próprios contatos e a resistência intrínseca do grafeno, porém sabe-se que a resistência de contato tende a ser bem pequena para monocamadas de grafeno e igual em todos os dispositivos.

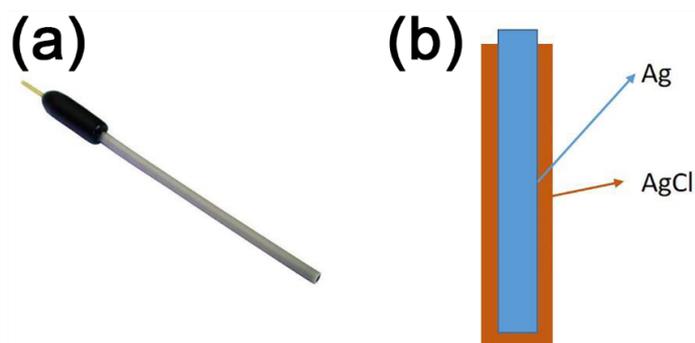
Para se modular a corrente  $I_{\text{FD}}$  que passa pelo grafeno e a resistência deste, um campo elétrico foi aplicado com a utilização de uma tensão de *gate*  $V_{\text{G}}$  com um  $V_{\text{FD}}$  fixo. Fizemos uso de uma arquitetura *top-gate* com o método de *gate* eletroquímico. Como já supramencionado, ao se aplicar uma tensão de *gate*, elétrons podem ser introduzidos ou retirados do grafeno, mudando, assim, a posição relativa em energia do nível de Fermi,  $E_{\text{F}}$ . Consequentemente, o transporte de elétrons pode ser realizado em uma banda de condução praticamente vazia, ao se elevar  $E_{\text{F}}$ , ou transportar buracos por uma banda de valência quase cheia, abaixando  $E_{\text{F}}$ . Esse fenômeno é bastante útil em GFET, pois permite que a condutividade do grafeno possa ser maior nesses estados de dopagem quando comparado ao seu estado normal ou intrínseco, i.e., quando está  $E_{\text{F}}$  em CNP (SCHWIERZ, 2010).

Ao longo do trabalho, as curvas experimentais são basicamente todas elas curvas de transferência  $V_{\text{G}} \times I_{\text{FD}}$ . Todos os resultados foram obtidos pelo programa MatLab 2015. Análises

complementares das curvas e de outros resultados foram realizadas também em Origin Pro 9.0, GraphPad Prism 6.05 e Microsoft Office® Excel 2016. As curvas  $I_{FD} \times V_G$  foram ajustadas no MatLab com algoritmo de suavização de Savortsky-Golay em um polinômio de 5ª ordem, depois obtivemos o ponto relativo da tensão de *gate* com o menor valor de corrente para cada uma das curvas.

### 3.7 Eletrodo de Referência de Ag/AgCl

O eletrodo de referência tem a função de manter um potencial fixo e devidamente conhecido durante a realização do experimento. O eletrodo Ag/AgCl consiste de uma junção de prata com cloreto de prata, que mantém um potencial fixo de 0,1 V no canal de grafeno. O eletrodo não-vazante escolhido, por ser de fácil manuseio e fabricação, foi da marca eDAQ modelo ET069 (Figura 16). A necessidade da utilização deste eletrodo de referência trona-se importante para que não ocorra corrente faradaica, ou seja, uma corrente oriunda da oxirredução de algum composto, que poderia interferir nas medidas. Além disso, o eletrodo de Ag/AgCl mantém um potencial constante em relação à solução, além de poucas interações que podem ocorrer com outras espécies químicas em solução, como proteínas (MINOT *et al.*, 2007). O eletrodo de platina produz uma maior corrente de fuga além de permitir um excesso de cargas contrárias na superfície do grafeno.

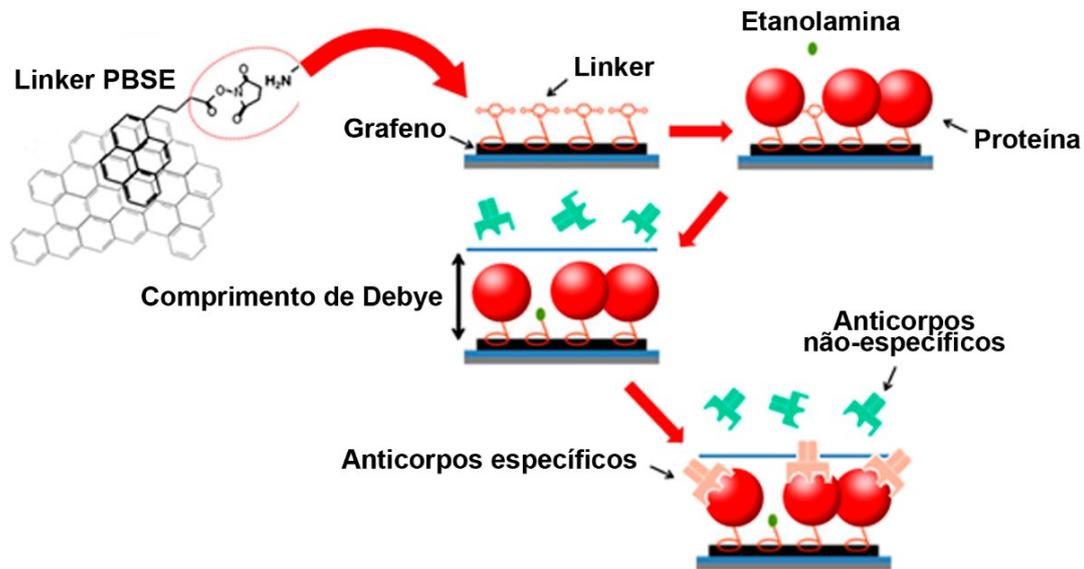


**Figura 16** – Eletrodo de referência comercial. (a) Fotografia do eletrodo eDAQ ET069 e (b) sua representação interna.

### 3.8 Funcionalização do Grafeno

O grafeno foi funcionalizado, primeiramente, com uma solução contendo um *linker*, uma molécula capaz de interagir com o grafeno e uma proteína e permanecer ligada a esses até o final do experimento. Funcionalizar o grafeno é fixar nele um elemento químico que fará a ponte entre o grafeno e o agente biológico, neste caso, o antígeno, a proteína ou a enzima. Nestes experimentos o *linker* utilizado foi o ácido 1-pirenobutanoico éster *N*-hidroxisuccinimida (PBSE, Sigma-Aldrich®) para a funcionalização (CHEN *et al.*, 2001). Como o PBSE possui baixa solubilidade em água, uma solução padrão foi feita com *N,N'*-dimetilformamida (DMF, Synth®), onde o PBSE estava na concentração de 10 mmol/L. O PBSE tem em sua base anéis aromáticos (pireno), que se ligam ao grafeno através de uma ligação do tipo empilhamento- $\pi$  e também possui uma terminação éster ligada a uma imida no grupo succinimida. A ligação entre o grafeno e o PBSE é não covalente e estável (LEE *et al.*, 2002). Quando em solução, o grupo succinimida sofre uma hidrólise na presença de uma amina primária, se ligando a proteínas pela amina. O PBSE é deixado interagir com o grafeno por 2 h em temperatura ambiente e depois lavado, primeiramente com DMF e depois duas vezes com água deionizada. Para a ligação das proteínas desejadas ao *linker*, 0,1 mL de uma solução contendo as biomoléculas em tampão fosfato salino (PBS) 0,15 mol/L, pH 7,2, é deixada incubando com o grafeno/*linker* por aproximadamente 20 h a 4 °C.

Uma solução de bloqueio se liga às moléculas de *linker* que não estão em excesso evitando que o anticorpo, ou outras moléculas, se liguem ao *linker*. A solução de bloqueio utilizado foi etanolamina ( $\geq 99,5\%$  Supelco®) 10 mmol/L em PBS 0,15 mol/L, deixada por 30 minutos em repouso dentro do arcabouço, lavado posteriormente com tampão. Para garantir que não haja interações inespecíficas ao grafeno, uma solução com 1% de polietilenoglicol (PEG)  $M_n$  6.000 (Sigma®) foi adicionada ao grafeno e deixada incubada por 2 h. Por fim, o grafeno está funcionalizado com os agentes desejados (Figura 17).



**Figura 17** – Esquema do processo de funcionalização do grafeno limpo, pronto para ser funcionalizado, com PBSE e com antígeno ligado. Partes ainda expostas do grafeno e do PBSE bloqueadas com etanolamina. A proteína funcionalizada no grafeno e o seu ligante devem estar dentro do comprimento de Debye. **Fonte:** Adaptado de OKAMOTO *et al.*, 2012.

### 3.8.1 Caracterização da funcionalização com proteínas

A primeira funcionalização foi feita para albumina sérica humana (HSA). Ensaio de microscopia de fluorescência foram feitos para se determinar a adesão de HSA ao grafeno. Uma lâmina de vidro com grafeno foi decorada com albumina sérica humana ( $\geq 99,9\%$ , Sigma® A3782) diretamente e depois exposta à anticorpos anti-HSA (IgG policlonal, Sigma® A0433) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC, ThermoFischer®). O HSA foi adicionado em gotas por micropipeta até que se cobrisse toda a superfície do grafeno, nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de caracterização do dispositivo, 1 mg/mL (15,3  $\mu\text{mol/L}$ ). Para se determinar a participação do PBSE, uma lâmina foi decorada com o *linker* antes da adição da albumina. Para comprovar a eficiência na cobertura da superfície do grafeno, PEG-6000 foi utilizado em outros dois ensaios, com e sem PBSE, e adicionado anticorpos anti-HSA marcados com FITC. Antes e após a adesão dos anticorpos, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 0,15 mol/L. As lâminas foram

observadas no microscópio EVOS® FL (ThermoFischer) do laboratório multiusuários do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

A segunda estratégia adotada foi o emprego da enzima acetilcolinesterase (AChE, EC. 3.1.1.7, *Electrophorus electricus*, liofilizada, Sigma-Aldrich®, C2888). Os chips contendo os GFETs foram incubados em uma solução de 3,0 µmol/L de AChE em tampão PBS de concentração 0,15 mol/L, pH 7,4, à 4 °C por 12 horas. Após este período os dispositivos foram lavados também com PBS por diversas vezes, para remover todo e qualquer resíduo de AChE que não adsorveu ao grafeno. Após todas estas etapas, o dispositivo estava pronto para realização de cinética enzimática.

A última funcionalização foi feita com anticorpos anti-aflatoxina B1, na concentração de 25 µg/mL. Os anticorpos monoclonais utilizados neste trabalho reconhecem este tipo persistente de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua e foram obtidos da ThermoFischer® (MA1-16885, clone 6A10, subtipo de κ-IgG<sub>1</sub> de camundongos).

### **3.8.2 Análises da funcionalização e atividade dos anticorpos anti-aflatoxina**

A fim de se determinar a especificidade dos anticorpos anti-AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, um ensaio de microscopia de fluorescência foi realizado com auxílio de um microscópio Olympus IX 70 do Laboratório de Sinalização de Cálcio. No ensaio, três fragmentos de grafeno CVD foram adsorvidos a três lamínulas de dióxido de silício e deixados aderir. Logo após, adicionamos uma solução contendo PEG-6000 e deixada secar sobre uma das lamínulas com grafeno, criando um bloqueio sobre esse. Em uma outra lamínula, uma solução contendo os intermediários da síntese foi adicionada, deixada secar e depois uma outra solução contendo PEG-6000 foi adicionada para bloqueá-lo e deixada secar. À terceira lamínula, uma solução contendo a fase orgânica com as frações contendo AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua foi adicionada a ela e deixada secar e, logo após, houve o bloqueio. As três lamínulas com grafeno foram três vezes lavadas com PBS entre cada uma das etapas de sensibilização e ao final

dessas. Paralelo à sensibilização, uma solução de tampão carbonato pH 10,0 contendo 50 µg/mL de anticorpos anti-AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e deixado reagir por 2 h a 37 °C preservado da luz. Imediatamente ao ensaio de microscopia, a solução de anticorpos marcados foi adicionada às lamínulas e lavadas com PBS por três vezes. As placas foram observadas em microscópio com filtro para FITC

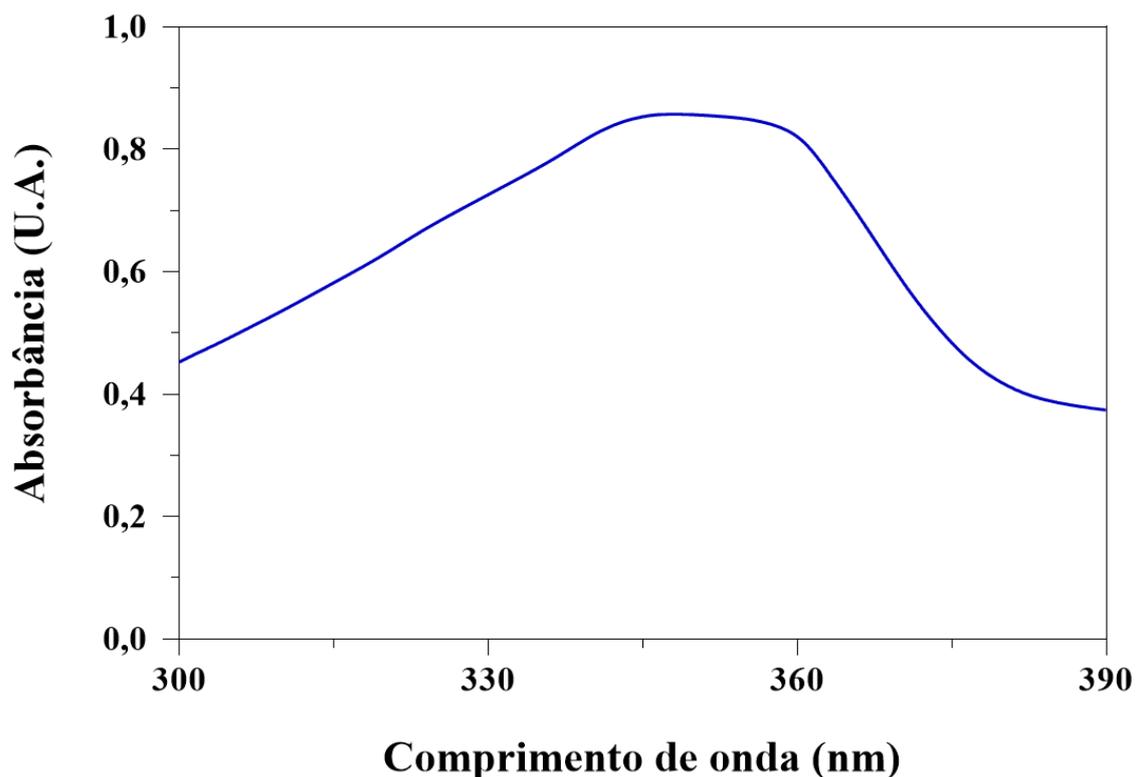
### 3.9 Síntese de Aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanina

O principal metabólito obtido pela ligação entre a AFB<sub>1</sub> ao DNA é o aducto de guanina, a AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, que é eliminado na urina em mamíferos e pode ser utilizado como biomarcador de exposição à essa micotoxina. A aflatoxina B<sub>1</sub> (Sigma<sup>®</sup> A6636) foi gentilmente cedida pela Funed junto à Dr<sup>a</sup> Jovita Gazzinelli Cruz Madeira e utilizado como substrato para produção sintética de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. Parte da AFB<sub>1</sub> liofilizada foi estocada a 4 – 8 °C, condições que a conservam por vários meses sem a perda, e dissolvida em metanol para quantificação em espectrofotometria (Figura 18) (AOAC, 2000).

Utilizamos o protocolo desenvolvido por Vidyasagar e colaboradores (1997) que utilizam o ácido 3-cloroperbenzoico ou ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA) como oxidante da reação (VIDYASAGAR; SUJATHA; SASHIDHAR, 1997). Resumidamente, 20 mg de MCPBA (Sigma<sup>®</sup>) foram dissolvidos em 4 mL de diclorometano (Merck<sup>®</sup>) e lavados com 4 mL de tampão fosfato 100 mmol/L, pH 7,4 por 4 vezes e desidratados com sulfato de sódio anidro (Sigma<sup>®</sup>). A quantidade de 0,64 µmol/L de AFB<sub>1</sub> foi dissolvida em diclorometano e convertida em AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido pela adição de 200 µL da solução de MCPBA e 500 µL do tampão fosfato. A reação ocorreu a 5 °C por 100 min sob agitação. Após esse período, 500 µL de uma solução de 0,32 µmol/L de guanina em tampão fosfato foi adicionada ao frasco de reação e deixado por 60 min a 5 °C sob agitação contínua. Ao final, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 min e a fase orgânica separada e à fase do tampão

foi adicionado diclorometano. Ambas as fases foram utilizadas para quantificação de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. A caracterização do material foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (GE<sup>®</sup> ÄKTA) utilizando uma coluna de fase reversa (C-18 Vydac 250 × 4,6 mm) a 25 °C, com fluxo ajustado a 1,0 mL/min de 30% acetonitrila/metanol (1:1 V/V) em 20 mmol/L de tampão acetato de amônia e medido a 360 nm. A AFB<sub>1</sub> conjugada com A aflatoxina B<sub>1</sub> conjugada com guanina foi obtida pelo protocolo de Vidyasagar e colaboradores (1997).

Para confirmação do produto da síntese, ensaio em espectrometria de massas foi realizado em MALDI-TOF Autoflex<sup>®</sup> Bruker com utilização de matriz de ácido 2,5-diidroxibenzoico (DHB), útil para análise de carboidratos e glicopeptídeos.



**Figura 18** – Espectro de absorvância ultravioleta de AFB<sub>1</sub> em metanol cedido pela prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jovita Gazzinelli, da FUNED. Na figura é possível observar um pico largo na região de 340-360 nm, característico da aflatoxina B<sub>1</sub> de acordo com o *Official Methods of Analysis. Natural Toxins*, Cap. 19, 2012.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

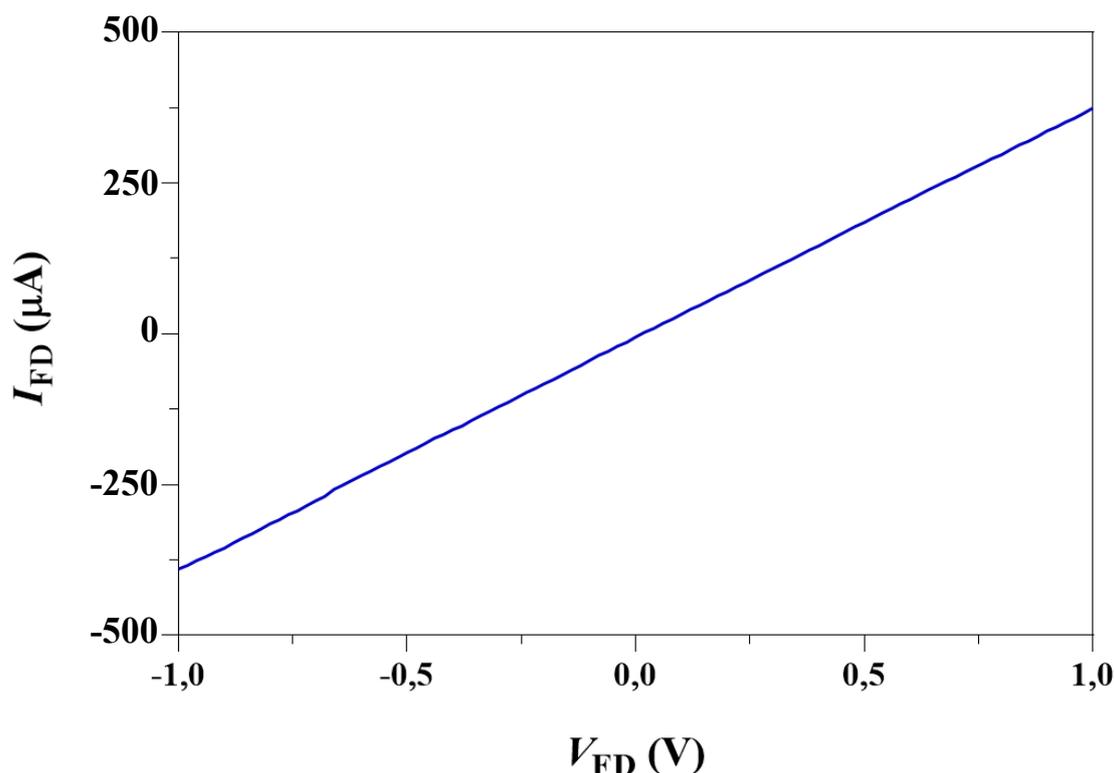
Como detalhado na seção de material e métodos, a parte inicial deste trabalho envolveu a própria fabricação dos chips contendo os contatos metálicos sobre um substrato de Si/SiO<sub>2</sub>. Isso foi realizado por microscopia óptica e medidas elétricas.

### 4.1 Caracterização elétrica dos chips não-funcionalizados

A condição intrínseca do grafeno construído em cada chip fabricado foi primeiramente caracterizada eletricamente. Foram obtidas curvas de corrente ( $I_{FD}$ ) por tensão de fonte e dreno ( $V_{FD}$ ), aplicando potenciais de -1,0 a 1,0 V entre eletrodos de fonte e dreno, para todos os conjuntos de eletrodos viáveis. A Figura 19 exibe a curva  $I_{FD} \times V_{FD}$  representativa para um típico GFET. Normalmente, amostras obtidas do crescimento realizado no laboratório apresentam resistências da ordem de 800 a 3 k $\Omega$ , e seu aspecto típico pode ser visualizado abaixo.

Ressalta-se que, as medidas de resistência de todos os dispositivos fabricados, inclusive os não incluídos neste trabalho, foram ôhmicas e tiveram valor entre 0,5 k $\Omega$  e 6,0 k $\Omega$ . Os grafenos com resistência acima desses valores foram sempre descartados das medidas. A média das resistências dos grafenos obtidos foi de 1,9 k $\Omega$  com desvio padrão de 1,3 com n=52.

Os valores de resistência podem ser considerados relativamente elevados, entretanto estão inseridos nesses valores a contribuição da resistência tanto intrínseca do grafeno quanto, também, do contato que na interface grafeno/metal (XIA *et al.*, 2011).



**Figura 19** – Gráfico de medida característica da medida do comportamento resistivo do dispositivo. Curva ôhmica com resistência de aproximadamente  $1,0 \text{ k}\Omega$  com  $V_{FD}$  de  $-1,0 \text{ V}$  até  $1,0 \text{ V}$ , tipicamente observado nos grafenos CVD obtidos no Laboratório de Nanomateriais.

## 4.2 Caracterização do grafeno CVD por espectroscopia Raman

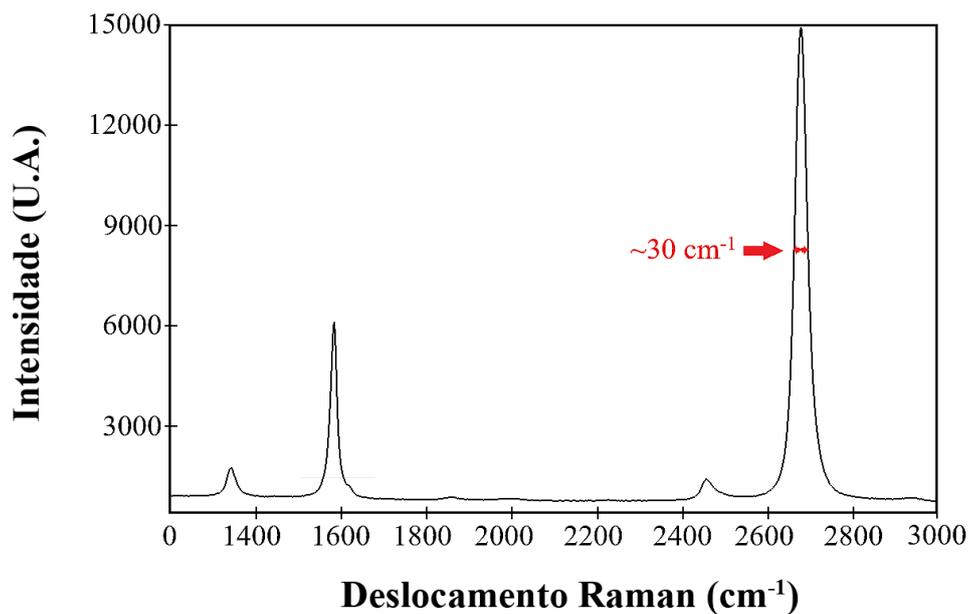
Para averiguar que o grafeno produzido era composto por uma monocamada, algumas medidas de espectroscopia Raman foram realizadas em alguns dispositivos. Esse método é bastante útil para caracterizar o grafeno produzido de modo a identificar monocamadas de grafeno obtido pelo processo CVD (FERRARI *et al.*, 2006). Um pico localizado a aproximadamente  $1.580 \text{ cm}^{-1}$  é chamado de banda G e é caracterizado como um espalhamento Raman de primeira ordem e está presente em compostos carbônicos com hibridização  $sp^2$ . Já as bandas 2D (aproximadamente  $2.700 \text{ cm}^{-1}$ ) e D ( $1.350 \text{ cm}^{-1}$ ) são provenientes de um processo de dupla ressonância. A banda  $G^*$  ( $2.450 \text{ cm}^{-1}$ ) também é caracterizada por um processo Raman de dupla ressonância (MALARD *et al.*, 2009; POPOV, 2016). Na espectrometria de Raman foi possível visualizar uma monocamada de grafeno, observada pela maior banda 2D em relação com a banda G. Também é importante notar uma banda

---

D evidente, possivelmente pela descontinuidade do filme devido a rasgos no processo de fabricação com folha de cobre (Figura 20). Para o grafeno CVD, considera-se aceitável para larguras de meia altura da banda 2D em torno de  $30 \text{ cm}^{-1}$  e a relação entre a intensidade dos picos 2D e G deve ficar entre 2-5 para representar uma medida típica de uma monocamada de grafeno crescido por CVD (BHAVIRIPUDI *et al.*, 2010).

A Figura 20 exibe um espectro Raman médio obtido da análise de sete áreas distintas de um mesmo filme de grafeno CVD. A relação da intensidade média entre os picos 2D/G foram maiores que 2, caracterizando a amostra de grafeno como uma monocamada.

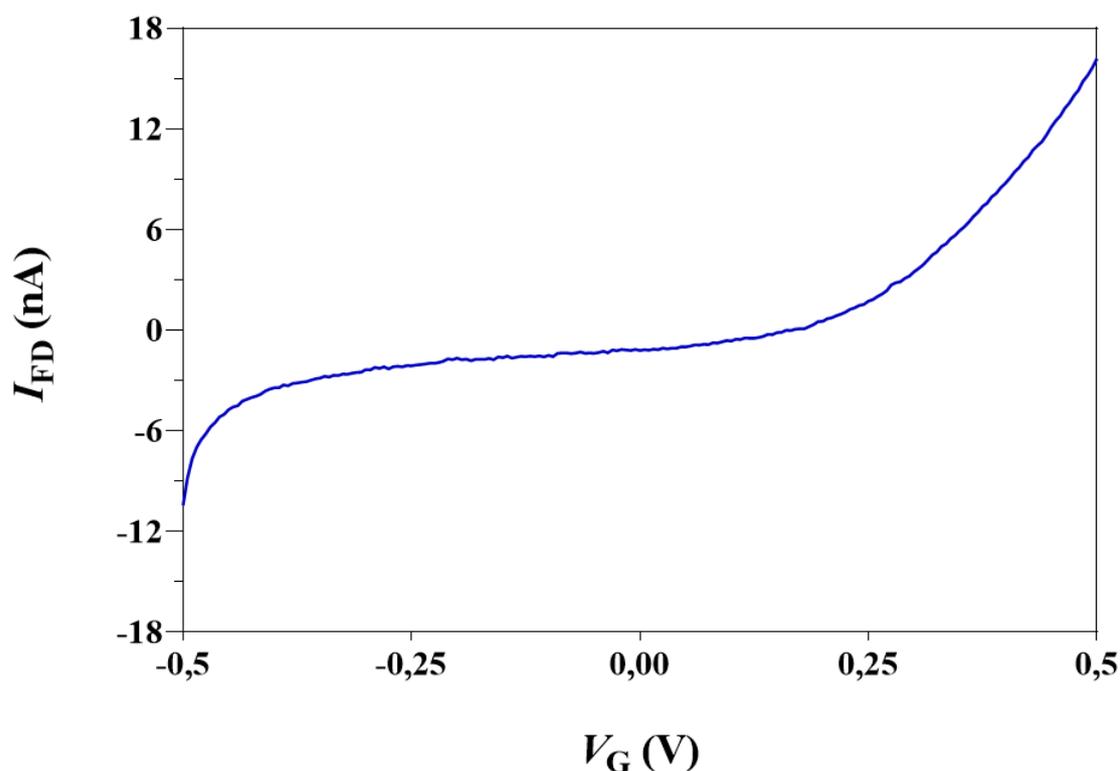
De modo sucinto, para uma monocamada de grafeno CVD espera-se que a banda 2D seja alargada e que a largura de meia altura da banda e haja a presença da banda D indicativa da existência de defeitos na amostra. Como pode ser observado, a intensidade da banda D é extremamente baixa, sugerindo que a mostra de grafeno CVD foi crescida em condições otimizadas para este trabalho e praticamente livre de grandes defeitos. Portanto, este experimento mostrou que com o método de crescimento de grafeno CVD empregado conseguiu-se obter grandes áreas de grafeno monocamada e livre de defeitos, características principais para a construção de GFETs com alta sensibilidade para a detecção de biomoléculas.



**Figura 20** – Espectro Raman de filme de grafeno CVD. Medida obtida pela média de sete espectros oriundos de um mesmo filme de grafeno. É possível observar as bandas 2D ( $2.700\text{ cm}^{-1}$ ),  $G^*$  ( $2.450\text{ cm}^{-1}$ ), G ( $1.580$ ) e D ( $1.350\text{ cm}^{-1}$ ), a largura de meia altura da banda 2D é de aproximadamente  $30\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.3 Grafeno como Sensor de pH

Com o intuito de utilizar o grafeno como um biossensor, foram avaliados primeiramente o comportamento e a resposta deste ao efeito de campo por meio da verificação das curvas de corrente ( $I_{FD}$ ) e tensão de porta ou *gate* ( $V_G$ ) quando os sensores estão em soluções com diferentes pH. Para tanto, usamos uma solução de tampão fosfato salino  $1,0\text{ mmol/L}$  com pH caracterizado. O transporte dos portadores de carga em GFET que estão em contato com uma solução eletrolítica através do eletrodo de referência foi demonstrado através da curva  $I_{FD} \times V_G$  em meio de solução PBS  $1,0\text{ mmol/L}$  pH  $7,4$ , variando-se  $V_G$ , porém com o sistema sem  $V_{FD}$ , uma curva de corrente de fuga (Figura 21).



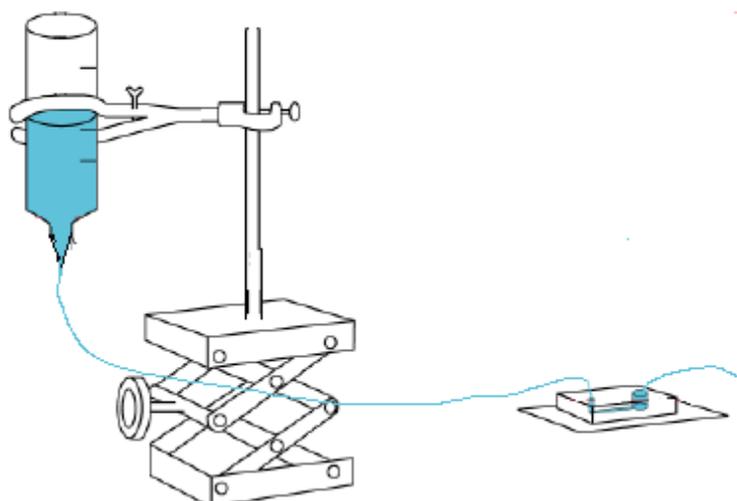
**Figura 21** – Gráfico de corrente de fuga característico do dispositivo com eletrodo de referência comercial, exibindo a corrente  $I_{FD}$  da ordem de  $10^3$  vezes menor que a observada em todos os experimentos, dentro da faixa de  $V_G$  utilizada ao longo do trabalho.

Como discutido anteriormente, os GFET operando em meio aquoso com eletrólitos podem ter a sua condutância modulada pela aplicação de uma tensão de *gate* entre o filme de grafeno e um eletrodo de referência, neste caso Ag/AgCl, na solução eletrolítica. Desse modo, essa tensão é capaz de deslocar o nível de Fermi ( $E_F$ ) da monocamada e alterar a condutância do dispositivo.

Um sensor foi utilizado para cada ensaio de pH contendo 27 contatos grafeno/ouro, divididos em 8 conjuntos de 3 contatos com um arcabouço de PDMS posicionada sobre o dispositivo permitindo que os contatos de grafeno permanecessem expostos ao líquido, mas evitando a perda de água para o ambiente, formando um sistema de macrofluídica.

Para os ensaios de pH, criamos um fluxo contínuo de solução através do canal de PDMS com uma seringa contendo a solução posicionada a uma altura de 30 cm acima do canal e uma mangueira de silicone com diâmetro interno de 0,75 mm fazendo a conexão entre eles. A diferença de altura

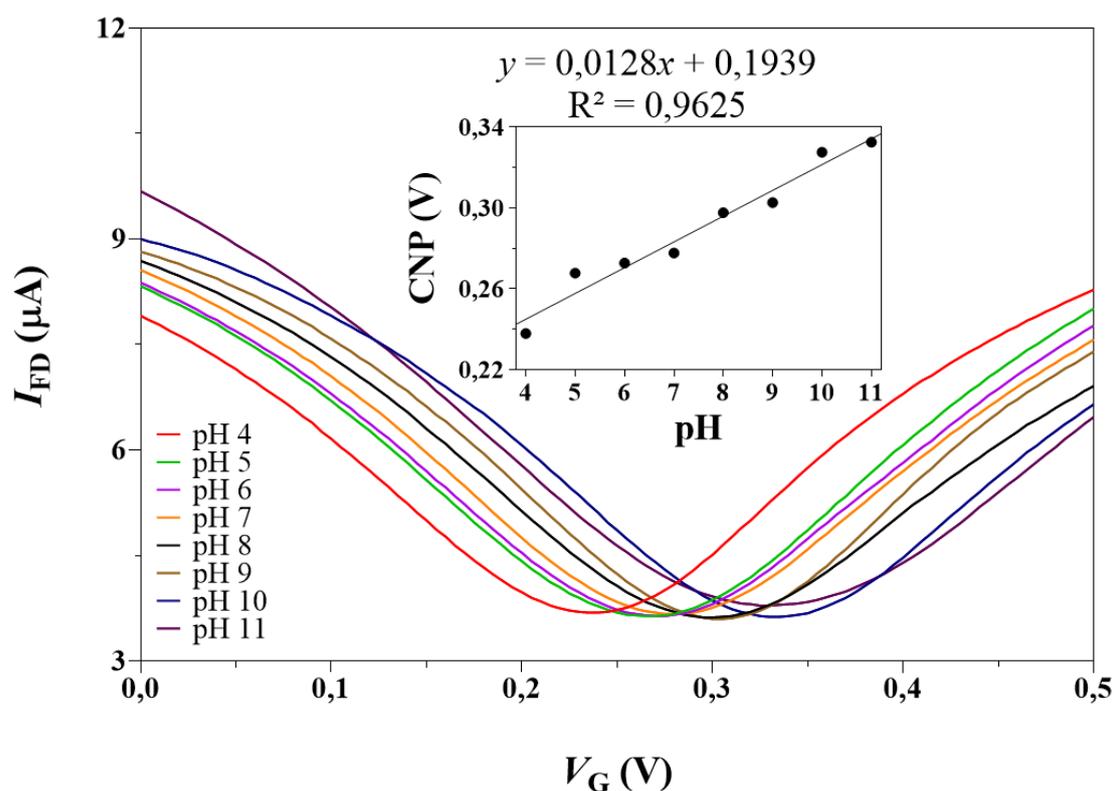
entre a seringa e o dispositivo foi ajustada a fim de se obter um fluxo de aproximadamente 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  desejado de solução pelo canal de PDMS, observando que na faixa de (10 a 30)  $\mu\text{L}/\text{min}$  os ruídos nas medidas são reduzidos. Na entrada do canal de PDMS, a mangueira conecta o canal à uma seringa e, através deste, são inseridas as soluções de trabalho ao biossensor. A seringa tem a abertura do embolo aberta, de forma que a solução possa escorrer pelo micro tubo sob efeito apenas da gravidade (Figura 22). Com o sistema montado, o eletrodo de Ag/AgCl, usado para aplicar a tensão de gate, foi inserido no furo superior do PDMS. O eletrodo usado é o ET069 da marca eDAQ.



**Figura 22** – Esquema dos testes de pH. Ilustração de como um fluxo de solução pelo canal é ajustado. Seringa contendo a solução entregue ao dispositivo. **Fonte:** Adaptado de OUELLETTE, 2008.

O PBS 0,15 mol/L desejado foi colocado na seringa e ajustado para o fluxo esperado, e com o PBS fluindo pelo canal, medimos uma curva  $I_{\text{FD}} \times V_{\text{G}}$ . Em seguida, adicionamos outro PBS com pH diferente e, novamente, foi feita a medida, e assim sucessivamente, até medir todas as soluções com os pH desejados. Uma fonte de tensão foi utilizada para o *gate*, uma fonte aplicou a tensão para o canal com grafeno, um multímetro fez a leitura da corrente no dreno e um pré-amplificador para amplificar o sinal de dreno. Em um primeiro experimento foram utilizadas soluções de HCl e NaOH que abrangiam os pH de 3-11 variando de 1 valor de pH. Foram escolhidos estes valores pois a relação

entre  $V_{\text{CNP}}$  e pH mantém uma linearidade, fora dessa faixa há uma mudança abrupta dessa relação (SOHN *et al.*, 2013). As curvas com estas soluções seguem uma linearidade para o aumento de pH, como demonstrado no gráfico da Figura 23.



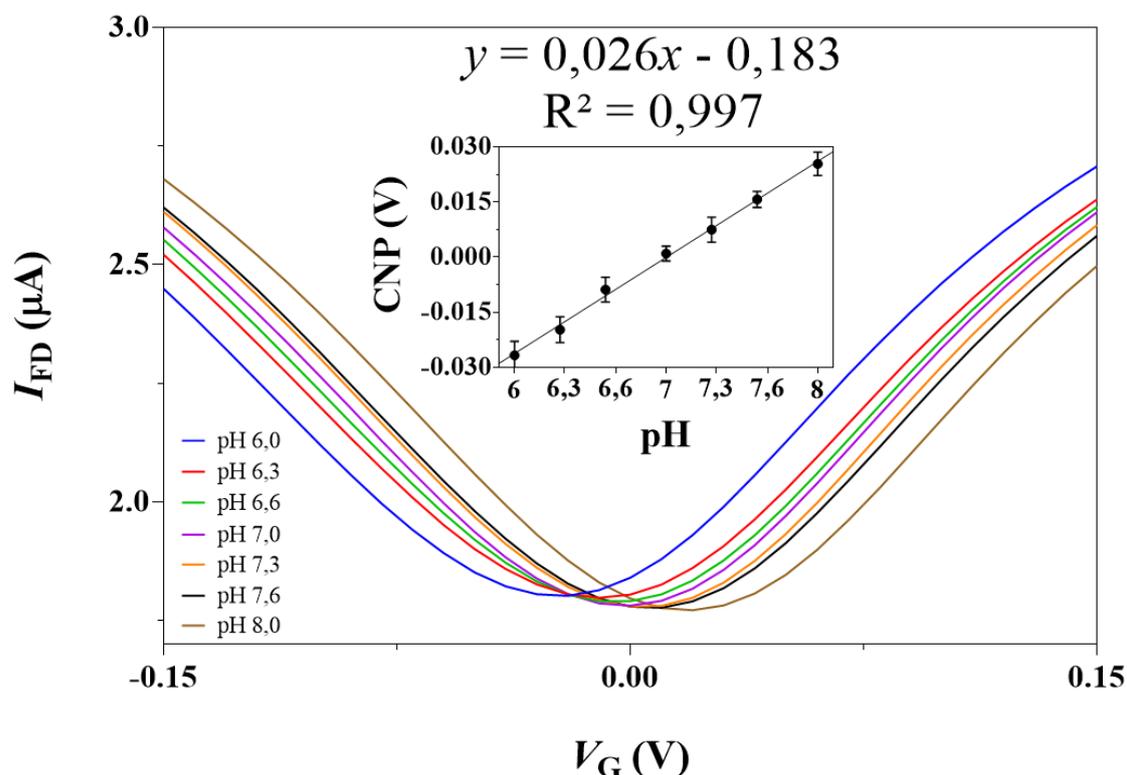
**Figura 23** – Gráfico das curvas para solução com pH 4-11. O experimento foi realizado com soluções de HCl e NaOH nos pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. No *inset* está a relação entre o valor de tensão no ponto de Dirac pelo pH.  $V_{\text{FD}} = 100$  mV.

Este resultado está de acordo com os da curva de *gate*, pois, como a tensão de *gate* era igual a 100 mV, nesta região a condutividade do grafeno diminui com a aumento do pH. Além disto, há um atraso de 1 minuto 30 segundos entre a adição da solução de PBS e a mudança da corrente no dispositivo. Este atraso é o tempo que a solução leva para percorrer o tubo que liga a seringa ao canal no dispositivo.

A tensão de *gate* no ponto de Dirac poderia ser muito mais próximo de zero do que os valores observados ao longo do trabalho. A razão para esta diferença é provavelmente devido a um efeito de

dopagem no grafeno, induzida principalmente pelo substrato ou pela contaminação da superfície do grafeno no processo de fabricação do dispositivo.

Em um segundo experimento, foram medidas a curva  $I_{FD} \times V_G$  com um fluxo de PBS, com diferentes pH, pelo canal. Os pH foram de 6-8 variando 0,3 valores de pH. O fluxo de PBS foi ajustado em 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 24).

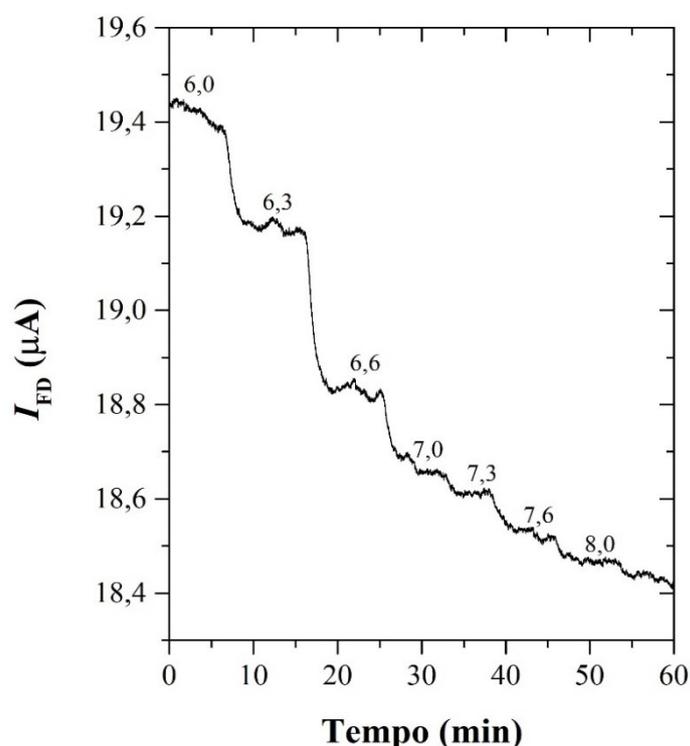


**Figura 24** – Gráfico das curvas para solução com pH 6-8. O experimento foi realizado com soluções de PBS ajustado aos pH 6,0; 6,3; 6,6; 7,0; 7,3; 7,6 e 8,0. No *inset* está a relação entre o valor de tensão no ponto de Dirac pelo pH.  $V_{FD} = 100$  mV e PBS 150 mmol/L.

No *inset* da Figura 24, tem-se um coeficiente angular da curva de 26 mV/pH, um valor próximo ao encontrado na literatura (ANG *et al.*, 2008; SOHN *et al.*, 2013).

Em um outro dispositivo, confeccionado para medir pH, escolheu-se uma tensão  $V_{FD}$ , fixou-se uma tensão  $V_G$  e foi monitorada a corrente  $I_{FD}$  enquanto o pH das soluções no canal era alterado. Foi escolhido uma tensão  $V_{FD}$  de 100 mV, uma tensão  $V_G$  de 100 mV e o fluxo de solução ajustado em 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . No momento em que o PBS na seringa atingia um valor menor que 50  $\mu\text{L}$ , uma nova

solução com pH diferente era adicionada. A Figura 25 contém o resultado da medida. Os valores no gráfico indicam o momento em que o PBS foi adicionado e o seu respectivo pH.

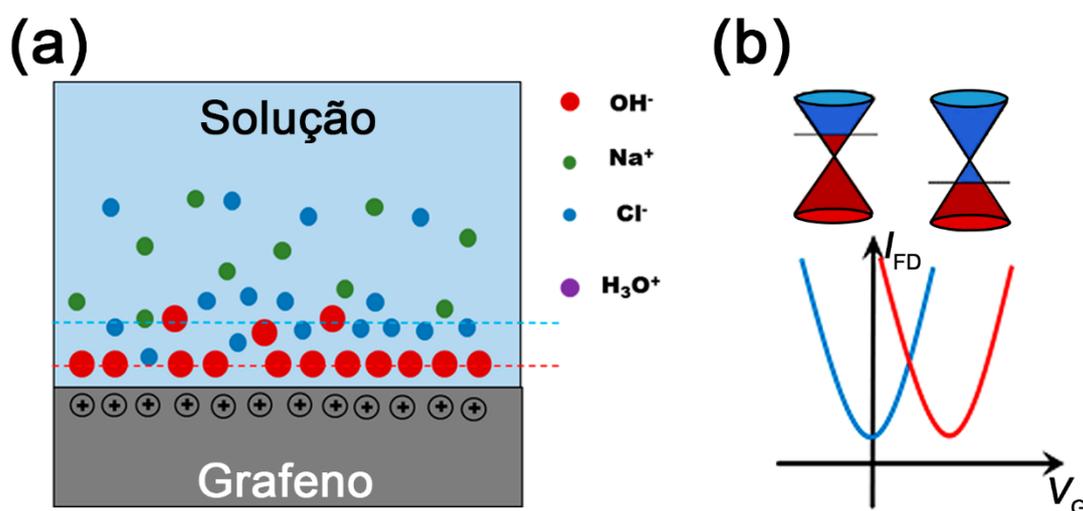


**Figura 25** – Gráfico do resultado da variação da corrente em função do tempo. A tensão de fonte-dreno e tensão de *gate* eram fixas em 100 mV para ambas. As setas indicam o momento em que um novo PBS com pH diferente é adicionado.

Simulações computacionais mostraram que, em solução aquosa, íons  $\text{OH}^-$  e íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  estão mais localizados na interface hidrofóbica, que é o caso do grafeno/água. Isso ocorre porque quando uma molécula de água polar perde ou ganha um próton, a carga adquirida está localizada fora do centro em relação ao O, assim, o comportamento tipo-surfactante dos íons é uma consequência direta da assimetria da sua distribuição de carga (COLE; ANG; LOH, 2011; KUDIN; CAR, 2008; MUNZ *et al.*, 2015). Além disso, já fora mostrado que a interação entre o dipolo permanente do  $\text{OH}^-$  e a superfície da água é o mecanismo dominante de adsorção em interfaces hidrofóbicas (ZANGI; ENGBERTS, 2005). (Figura 26 a).

Alguns trabalhos vêm mostrando que o grafeno é sensível a mudanças de pH no ambiente aquoso no qual ele está imerso. Apesar de poucos trabalhos e estudos a respeito do grafeno como um

sensor pH, avanços no entendimento deste mecanismo têm sido alcançados. Logo, essa mudança com o decréscimo da corrente com o aumento do pH pode ser explicada pela mudança em uma direção horizontal do gráfico de tensão de *gate* (Figura 26 b).



**Figura 26** – Formação da bicamada que induz cargas no grafeno devido a organização dos íons de  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  na interface grafeno/solução. A adsorção de  $\text{OH}^-$  induz buracos no grafeno, dopando-o tipo-*p* (a), com isso a curva de *gate* se transloca para direita do eixo de  $V_G$  (b), indicando uma transferência de elétrons do grafeno para a solução.

É provável que íons  $\text{OH}^-$  têm uma melhor organização na interface grafeno/água e, portanto, induzem mais buracos no grafeno, devido à interação dos elétrons no orbital  $p_x$  do oxigênio no  $\text{OH}^-$  e o orbital  $p_z$  (orbitais moleculares  $\pi$ ) do grafeno (ANG *et al.*, 2008).

Outros íons, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , por exemplo, não se organizam de tal forma na interface. O  $\text{Na}^+$  sofre solvatação pelas moléculas de água e ficam dispersos na solução. O  $\text{Cl}^-$  apesar de também se concentrar próximo a interface, permanece mais distante do mesmo em comparação com ao  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  em soluções sem altas concentrações de íon cloreto (COLE; ANG; LOH, 2011). Dessa forma, o grafeno é mais sensível às concentrações de  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$ , cuja maior concentração desses íons é próximo à interface.

Assim, a formação da bicamada de cargas induzidas devido a organização dos íons na interface grafeno/água leva à uma dopagem do grafeno. A adsorção de  $\text{OH}^-$  induz buracos no grafeno, dopando-o tipo-*p*. Já a adsorção de  $\text{H}_3\text{O}^+$  induz a passagem de elétrons para o grafeno, dopando-o tipo-*n*. No entanto, alguns defeitos no grafeno que foram criados durante a fabricação do dispositivo ou mesmo da transferência para seu substrato podem ser os responsáveis pela sensibilidade ao pH. Estes defeitos criam grupos químicos reativos na superfície do grafeno que podem interagir com íons da solução eletrolítica e suscitam a resposta dos GFETs ao pH do meio (FU *et al.*, 2011).

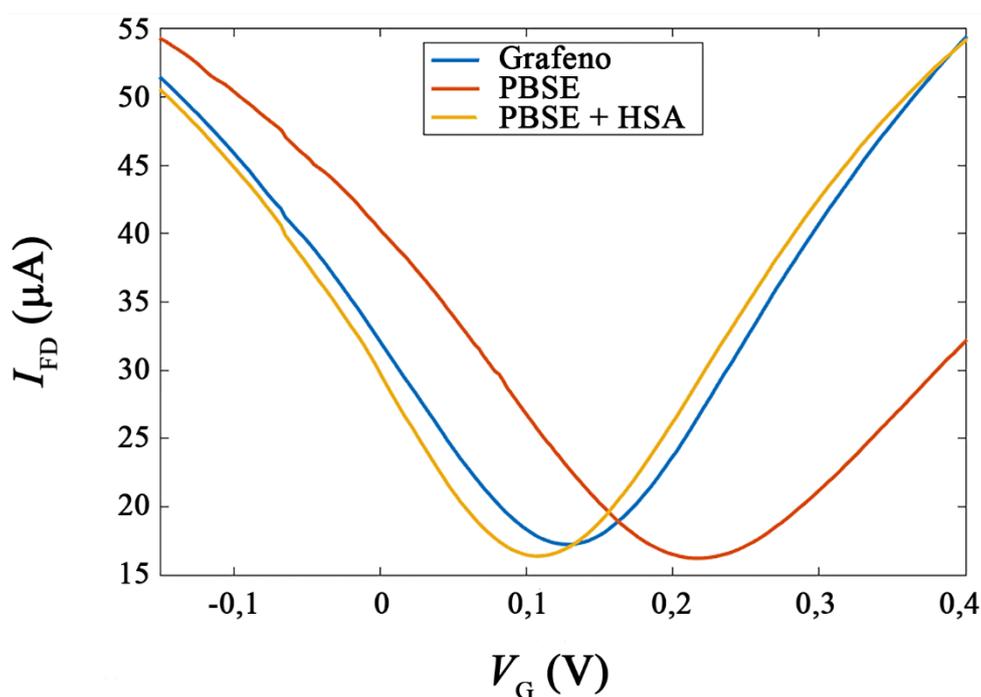
#### 4.4 Caracterização da Funcionalização

A funcionalização consiste em imobilizar moléculas no grafeno, com o intuito de criar condições para que o mesmo detecte biomarcadores. A fixação destes componentes pode promover defeitos, transferir cargas para o grafeno e, portanto, mudar algumas de suas propriedades elétricas, por exemplo, o mínimo de condutividade (CNP) e a mobilidade elétrica. Com a finalidade de estudar e caracterizar essas possíveis mudanças nas características do grafeno medidas de curva  $I_{\text{FD}} \times V_{\text{G}}$  foram realizadas.

O processo de caracterização utilizado consiste em realizar uma curva  $I_{\text{FD}} \times V_{\text{G}}$  para cada etapa de funcionalização: grafeno sem funcionalização, grafeno com um *linker* e uma proteína. A proteína escolhida para esta etapa foi a albumina sérica humana (HSA), abundante no plasma humano, sem nenhum resíduo de carboidrato em sua forma fisiológica e com ponto isoelétrico de 5,3 (KRAGH-HANSEN, 1981). Como ela é uma proteína que possui alta capacidade de manter a conformação original em uma miríade de microambientes químicos, ela é considerada uma proteína muito interessante para os estudos de imobilização e detecção de biossensores do tipo FET.

Ao se adicionar o *linker* PBSE ao grafeno, há uma mudança do CNP na curva  $I_{\text{FD}} \times V_{\text{G}}$ , indicando que o PBSE, por possuir o grupo succinimidil é capaz de capturar elétrons da superfície do

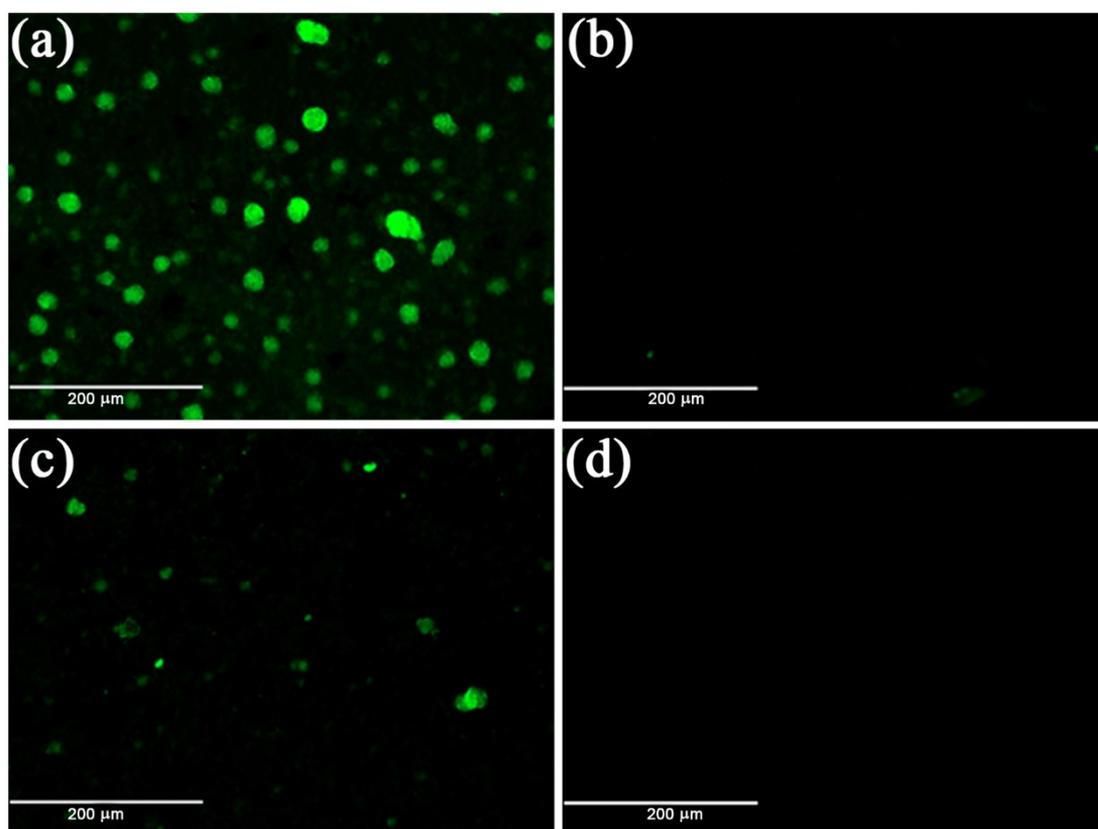
grafeno, induzindo buracos neste e fazendo uma dopagem do tipo-*p*. Um fato interessante é que a HSA tem um ponto isoelétrico de  $\sim 5,3$ , abaixo do pH do tampão fosfato, que é de 7,4. O pI de um peptídeo é o ponto de pH onde o somatório de cargas totais é nulo e valores de pH acima deste ponto causam um excesso de cargas negativas no peptídeo, deste modo, a HSA em pH 7,4 encontra-se carregada negativamente. Essas cargas na proteína causam um aumento de elétrons no canal de grafeno, tornando-o dopado tipo-*n*. Os resultados indicam que o PBSE é um bom agente de funcionalização do grafeno, pois consegue se fixar ao grafeno, assim, pode-se afirmar que a funcionalização do grafeno foi efetiva, pois as moléculas de fato se ligaram ao grafeno sem grandes alterações em suas propriedades elétricas. A Figura 27 contém o resultado destas medidas.



**Figura 27** – Gráfico das curvas de *gate* em diferentes etapas da funcionalização. A funcionalização do grafeno com o PBSE promove uma dopagem tipo-*p* no grafeno. A funcionalização do grafeno com PBSE+HSA, promove uma dopagem tipo-*n* no sistema, fazendo com que a mobilidade elétrica volte para valores próximos às do grafeno sem funcionalização.  $V_{FD} = 100$  mV.

Imagens de microscopia de fluorescência foram feitas na presença e ausência de PBSE. A HSA adicionada ao grafeno se liga a este formando aglomerados em sua superfície (Figura 28 a). As

interações hidrofóbicas ajudam na adesão de proteínas ao grafeno (OHNO *et al.*, 2009). Essas interações, no entanto, são fracas e facilmente rompidas. Com a utilização de um *linker*, apenas as proteínas ligadas covalentemente a este, permanecem próximas ao grafeno, reduzindo a aglomeração e forçando que o anticorpo interaja com a HSA dentro do limite do comprimento de Debye (Figura 28 b). Nos ensaios com PEG-6000 funcionando como controle negativo, mostra que a adição do *linker* evita que espaços no grafeno fiquem disponíveis ao anticorpo, que poderia interagir com o grafeno, causando um ruído na medida e um falso positivo no resultado (Figura 28 c e d).



**Figura 28** – Imagens de microscopia de fluorescência de lâminas de vidro decoradas com albumina e PEG-6000. Em (a) HSA diretamente no grafeno, mostrando pontos de aglomeração em sua superfície. Em (b) PEG-6000 diretamente no grafeno, mostrando poucas regiões onde o anticorpo anti-HSA aderiu ao grafeno. Em (c), com a adição de PBSE, a HSA se distribui majoritariamente uniforme ao longo da superfície do grafeno, com baixa densidade de proteínas. Em (d) PEG-6000 PBSE, mostrando quase nenhuma região onde o anticorpo anti-HSA aderiu ao grafeno.

---

Os anticorpos são grandes moléculas volumosas que possuem afinidade efetiva pelo antígeno quando em uma fase sólida determinada pela sua orientação e pela cobertura que fazem em uma superfície (CHAMES *et al.*, 2009). Além disso, os anticorpos têm dois sítios de ligação que introduzem um equilíbrio ligante-receptor extra. Para conseguirmos aumentar a interação ligante-receptor, exploramos os efeitos da cobertura superficial com concentrações em massa. Para anticorpos conjugados através de ligações covalentes sem espaçador, a ligação anticorpo-fase sólida tem um comportamento linear em baixa cobertura de superfície para então atingir um limite de ligação em altas concentrações de anticorpo (SAHA; EVERS; PRINS, 2014). Um ponto importante é que nessas experiências os anticorpos foram imobilizados em orientações aleatórias, sugerindo que a aglomeração de superfície (*molecular crowding*) é um dos principais fatores que afetam a ligação do anticorpo. A inclusão de um espaçador melhora grandemente a quantidade de ligante-receptor formados e há uma melhora na capacidade de captura de antígenos em função da cobertura superficial (ZHAO; MATSUI, 2007). Embora os anticorpos não possam se desprender quando ligados covalentemente, a fase sólida, no caso o grafeno, pode causar uma reorganização na superfície otimizando o número de antígenos ligados e a configuração do espaçador-anticorpo. Isso significa possuir as condições para um equilíbrio termodinâmico, resultante da interação entre a diminuição da energia livre de ligação e os efeitos do *molecular crowding* (MALASPINA; LONGO; SZLEIFER, 2017).

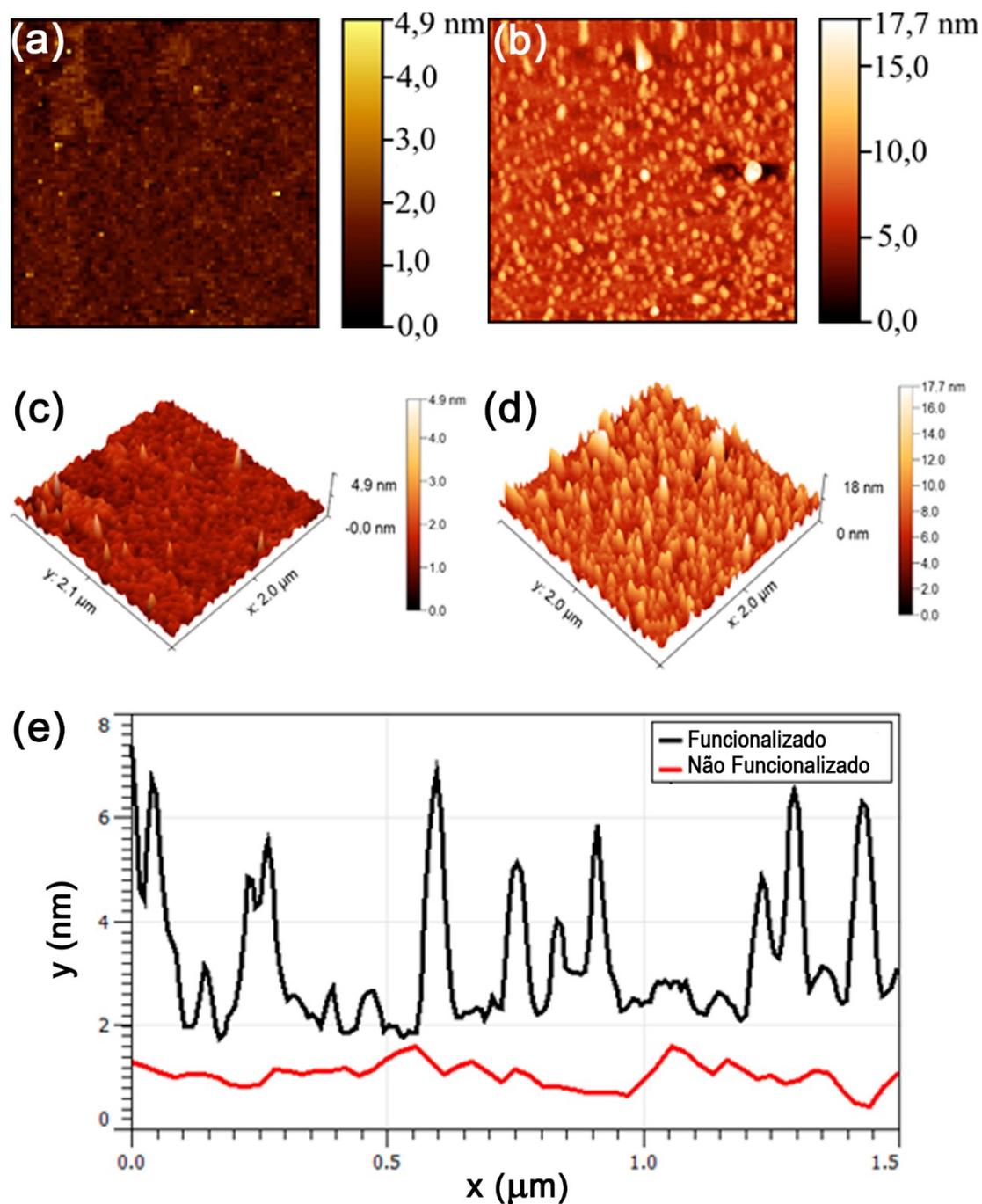
A partir da análise das imagens da Figura 28, fica claro o papel da funcionalização com ácido piernobutanoico succinimidil éster para a conjugação uniforme e de elevada densidade de proteínas sobre grafeno CVD. Além disso, a imobilização sobre o grafeno se mostrou extremamente estável, onde não se observou a lixiviação destas após sucessivas etapas de lavagem.

#### 4.5 Caracterização topográfica

Uma análise de microscopia de força atômica foi realizada para se visualizar a distribuição em nível nanométrico do conjunto PBSE e HSA. Percebe-se que o grafeno sem nada tem uma superfície bem regular e sem grandes alterações do relevo (Figura 29 a). Já com o grafeno funcionalizado, há grandes alterações do próprio relevo e com alturas condizentes com os tamanhos aproximados da albumina humana, de aproximadamente  $24,7 \pm 0,35 \text{ \AA}$ , formando pequenos aglomerados em alguns pontos (Figura 29 b) (KISELEV *et al.*, 2001).

As imagens do mapa topográfico em 3D (Figura 28 c-d), assim como o perfil topográfico, comprovam que uma elevada densidade de proteínas foi imobilizada na superfície do grafeno. Porém, é possível visualizar que a imobilização ocorreu de forma uniforme, praticamente como uma monocamada e onde regiões de aglomeração ou sobreposição são escassas.

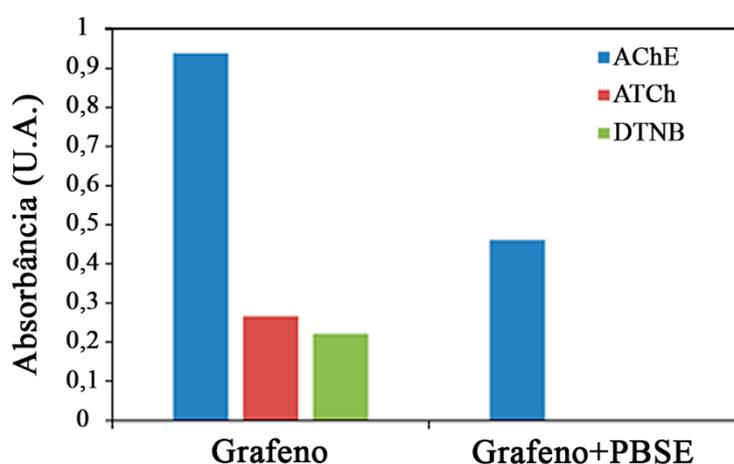
Na figura 29 e está registrado o perfil topográfico relativo à figura 3 a-b, evidenciando pouca variação do relevo quando o grafeno não está funcionalizado e modificações no perfil quando a funcionalização com HSA é feita.



**Figura 29** – Microscopia de força atômica do grafeno funcionalizado e não funcionalizado com PBSE+HSA. Em (a) microscopia de força atômica mostrando área de grafeno sem proteína e não funcionalizado. Em (b) área do grafeno funcionalizado e com grafeno, exibindo uma distribuição quase uniforme de albumina e alguns pontos de maior relevo. Em (c) perspectiva de relevo do grafeno sem HSA+PBSE e em (d) com HSA+PBSE. Em (e), gráfico do perfil de relevo de (a) e (b).

#### 4.5.1 Resposta elétrica pós-funcionalização

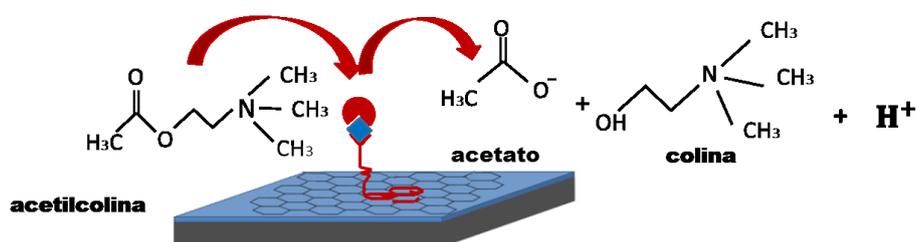
Para se avaliar a capacidade do grafeno responder a mudanças provocadas por cargas em sua superfície após a funcionalização, uma análise do método de Ellman para a acetilcolinesterase foi realizada. A acetilcolinesterase foi aderida a uma fita de grafeno pelo método de funcionalização já descrita por *linker*. O grafeno foi transferido para um substrato de SiO<sub>2</sub>/Si limpo, sem litografia. A área de reação foi delimitada por uma piscina de PDMS, o sobrenadante gerado no ensaio foi recolhido e lido em espectrofotômetro Varioskan® na faixa de 405 nm. O ensaio mostrou que há mais moléculas de AChE na superfície do grafeno sem PBSE, assim como no experimento anterior. Ainda existe uma atividade quando o *linker* é adicionado antes, mas ela é menor. Nos experimentos controle, foram adicionados o substrato acetiltiocolina e o reagente de Ellman sem a enzima, e na última apenas o reagente de Ellman (Figura 30). Isso demonstra que o PBSE é eficaz na adesão da acetilcolinesterase e não elimina sua atividade catalítica e que o substrato da enzima não interage com o *linker* e nem outras moléculas cujas estruturas não possuem amina primária.



**Figura 30** – Gráfico da absorbância em 294 nm para a acetilcolinesterase no grafeno. Em azul, AChE foi adicionada ao grafeno com e sem PBSE. Em vermelho foi adicionado apenas ATCh (acetiltiocolina) e DTNB (reagente de Ellman), sem AChE, para verificação da hidrólise espontânea do substrato presente ou não. Em verde, apenas o DTNB, para verificação de sua hidrólise espontânea. Virtualmente não há a presença dos sinais de ATCh e DTNB na presença de *linker*.

#### 4.6 Sensor de acetilcolina

O sensor de acetilcolina, consiste em utilizar o dispositivo funcionalizado com o *linker* (PBSE) e a enzima acetilcolinesterase ligada ao *linker*. A acetilcolinesterase, ao entrar em contato com a acetilcolina, consegue clivar a acetilcolina resultando nos produtos colina mais ácido acético o que reduz o pH da solução (Figura 31).

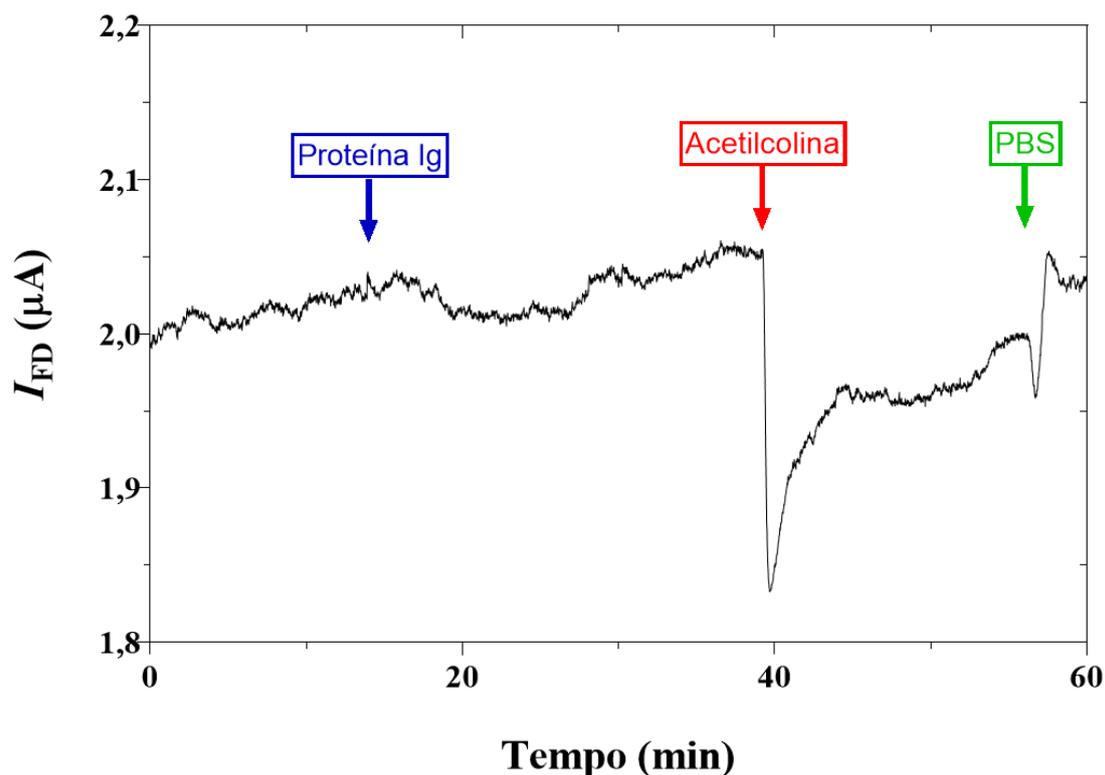


**Figura 31** – Clivagem da acetilcolina pela acetilcolinesterase.

Com o grafeno funcionalizado com PBSE e AChE, uma medida da resistência foi feita para averiguar as condições do contato grafeno/ouro. Uma tensão de  $V_{\text{FD}}$  foi aplicada, de -100 mV até 100 mV e novamente verificamos que o contato é ôhmico, agora com uma resistência de 4 k $\Omega$ .

Assim, estabelecido as condições de contato, uma tensão  $V_{\text{G}}$  foi fixada em um ponto onde a curva  $I_{\text{FD}} \times V_{\text{G}}$  possui a maior inclinação, ou seja, maior mobilidade dos portadores de carga. Esta escolha tem como base que é neste ponto onde a condutância é mais sensível a modificações de dopagem no grafeno.

No ensaio para detectar a reação da acetilcolinesterase, foi mantido um fluxo de tampão fosfato salino 0,15 mol/L em 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , com o valor de  $V_{\text{FD}} = 10$  mV e um tensão de *gate* de -50 mV (maior inclinação da curva). Em um determinado momento à solução de PBS foi adicionado PBS + acetilcolina 3,33 mmol/L, em seguida PBS (Figura 32).



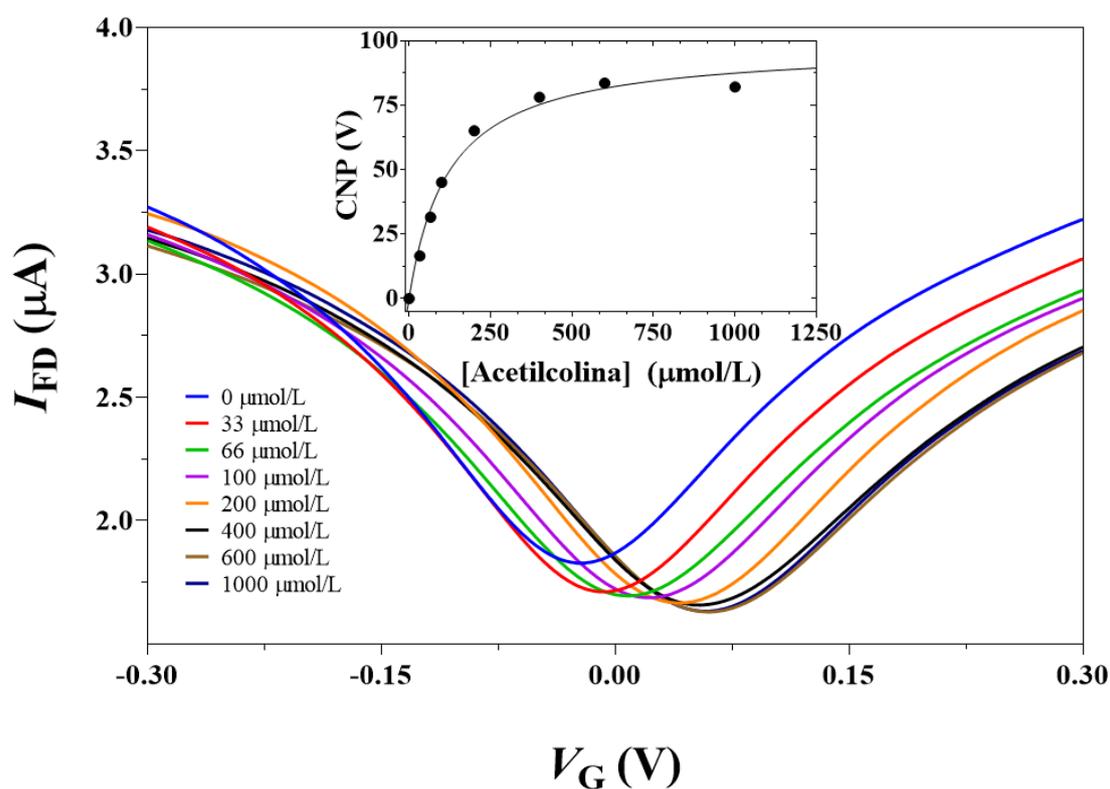
**Figura 32** – Gráfico corrente por tempo do sinal específico da catálise pela AChE. Indicado no gráfico as inserções de proteína Ig (não-específica), acetilcolina 3,33 mmol/L e PBS, lavando o sistema, em cada uma das setas.

No ensaio foi averiguado a seletividade do sistema. Com o biossensor mantido na configuração anterior, foi adicionado no canal PBS + IgG anti-HSA (3,33 mmol/L), proteína que em princípio não reage com acetilcolinesterase. Pode-se notar que não é observado nenhuma mudança considerável na corrente no dreno. Com a adição de PBS + acetilcolina 3,33 mmol/L após o sistema alcançar uma estabilidade, a catálise promovida acetilcolinesterase mostrou que a medida de corrente por tempo se altera à medida que há um acréscimo de acetilcolina ao sistema. As alterações podem ser devidas à formação dos produtos da catálise enzimática, originando  $H_3O^+$  e este altera as cargas sobre a superfície do grafeno. O ensaio com a adição de PBS após a catálise promovida acetilcolinesterase mostrou que o sistema consegue retornar para seu estado inicial.

Após a injeção de substrato pela seringa, há uma diminuição no valor na corrente decorrente da modificação da condutância do grafeno, porém o valor permanece inalterado por algum tempo,

por volta de 15 minutos. Isso se deve à enzima alcançar o estado estacionário nos tempos iniciais, desse modo, a velocidade da reação se mantém constante e paralela à linha base, até que ocorra a adição de mais substrato ou o completo consumo deste (HORN *et al.*, 2018).

Experimentos sequenciais com adição de concentrações variadas de acetilcolina permitiram visualizar a cinética da enzima acetilcolinesterase (Figura 33). Ao se comparar o ponto de condutividade mínima com as concentrações de acetilcolina inseridos no canal de PDMS, verifica-se uma relação hiperbólica, assim como Michaelis-Menten (Figura 33 *inset*). Isso indica uma saturação da cinética das enzimas adsorvidas no grafeno, o que não permite uma maior formação de  $H_3O^+$ , refletindo no platô observado.



**Figura 33** – Gráfico das curvas para cinética catalítica de AChE. Diferentes concentrações de acetilcolina foram utilizadas para avaliar o perfil catalítico da enzima AChE. No *inset* está a relação entre o valor de tensão no ponto de Dirac pela concentração de acetilcolina, exibindo uma curva cinética hiperbólica similar à Michaelis-Menten.

Os resultados obtidos mostram que a funcionalização do grafeno com PBSE e acetilcolinesterase é eficiente para o sensoriamento da acetilcolina. Este sensoriamento é feito indiretamente, pois o que se mede é a mudança de pH da solução, induzida pela quebra da acetilcolina.

O efeito da ação enzimática pode ser visualizado pela formação de ácido, que é ionizado em pH 7,0, o qual foi utilizado em todos os experimentos com a enzima. Os experimentos demonstram que, apesar de ligada ao PBSE, a AChE continua ativa, fazendo a quebra da acetilcolina. Com isso, há um aumento da concentração de íons  $H^+$ , que leva à diminuição do pH da solução, alterando a dopagem do grafeno, modificando o número de cargas que se localizam na interface do grafeno/solução, de forma similar à observada com a mudança de pH, o que corrobora o fato do grafeno ser um sensor de pH.

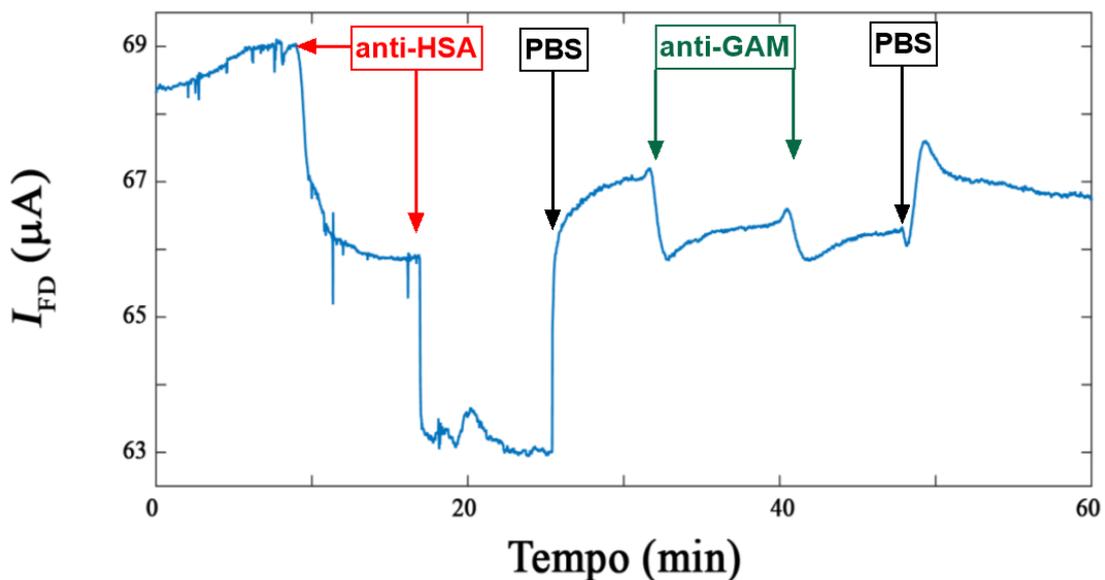
Pode-se presumir que a acetilcolinesterase está imobilizada ao grafeno pelo *linker*, com isso, os produtos formados pela quebra da acetilcolina (colina + acetato) se difundem pela solução. A partir dos pressupostos do estado-estacionário, toda enzima entra em uma fase estacionária, onde a velocidade de formação de produto se mantém constante ao longo do tempo, essa fase pode ser bem visualizada pelo platô observado logo após a adição contínua de acetilcolina (PUTZ; LACRAMA; OSTAFE, 2006). Isso indica que a metodologia com grafeno pode ser bastante útil para estudar cinética enzimática e os efeitos que algumas substâncias podem ter de inibir a atividade enzimática. Isto abre a possibilidade de desenvolver um sensor de glifosato, que pode interagir com essa enzima, alterando sua função (GLUSCZAK *et al.*, 2006; MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2012).

#### **4.7 Detecção albumina humana**

O nosso GFET foi capaz de detectar mudanças do pH das soluções, deste modo, o dispositivo foi em seguida avaliado se como sensor de albumina humana. Neste experimento, o grafeno foi

sensibilizado com a HSA e o anticorpo anti-HSA foi adicionado na solução para ser capturado pela albumina.

Para verificar se há detecção do anti-HSA, utilizamos o sistema de fluxo contínuo com auxílio da bomba de passo, onde foi criado um fluxo de PBS de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a tensão de  $V_{\text{FD}}$  fixada em 100 mV e a tensão  $V_{\text{G}}$  em -75 mV. Neste modelo, monitoramos apenas a corrente no dreno. A corrente foi deixada estabilizar por 8 minutos, quando à solução de PBS 0,15 mol/L adicionamos o anti-HSA na concentração de 3,33  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . Foi permitida a estabilização do sinal elétrico por 8 min e, ao final deste período, adicionamos novamente uma solução com anti-HSA 6,66  $\mu\text{mol}/\text{L}$  e deixada até nova estabilização da corrente. Após isso, adicionamos solução de anti-G.A.M (anti-human polyvalent IgG, IgA, IgM from rabbit, Sigma® I8010) como anticorpo não específico, na concentração de 3,33  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . Após três adições sucessivas interpassadas por 8 min, adicionamos PBS 0,15 mol/L somente. O resultado obtido é exposto na Figura 34.



**Figura 34** – Resultado da medida do biossensor, com as setas indicando o momento em que as soluções anti-HSA (vermelha), apenas PBS (preta) e anticorpo não-específico (verde) foram inseridas no sistema.

Na segunda adição de PBS, a corrente não retorna ao valor anterior. Isto é devido ao fato de que o HSA se liga fortemente com a anti-HSA e esta ligação não é facilmente desfeita, uma ligação alta afinidade. O valor da corrente se assemelha àquela após a primeira adição de anti-HSA. Também foram realizadas medidas para verificar se o dispositivo é seletivo. O procedimento é semelhante ao descrito anteriormente, porém foi adicionado PBS + anti-G.A.M humano, como visualizado na Figura 34. A figura mostra que houve uma pequena mudança na corrente  $I_{FD}$  que indica uma possível interação da proteína anti-G.A.M humano com regiões ainda exposta do grafeno ou do PBSE, possivelmente porque o procedimento de bloqueio pode não ter sido efetivo ou houve ligação inespecífica entre o anticorpo anti-G.A.M. e a albumina. Como essa interação é fraca, foi facilmente rompida pelo fluxo de tampão, mostrando a avidéz dos anticorpos pela ligação ao antígeno. Esta interação, anti-G.A.M humano com o grafeno, pode ter dopado o grafeno momentaneamente ou adicionados defeitos no mesmo, mudando sua condutividade.

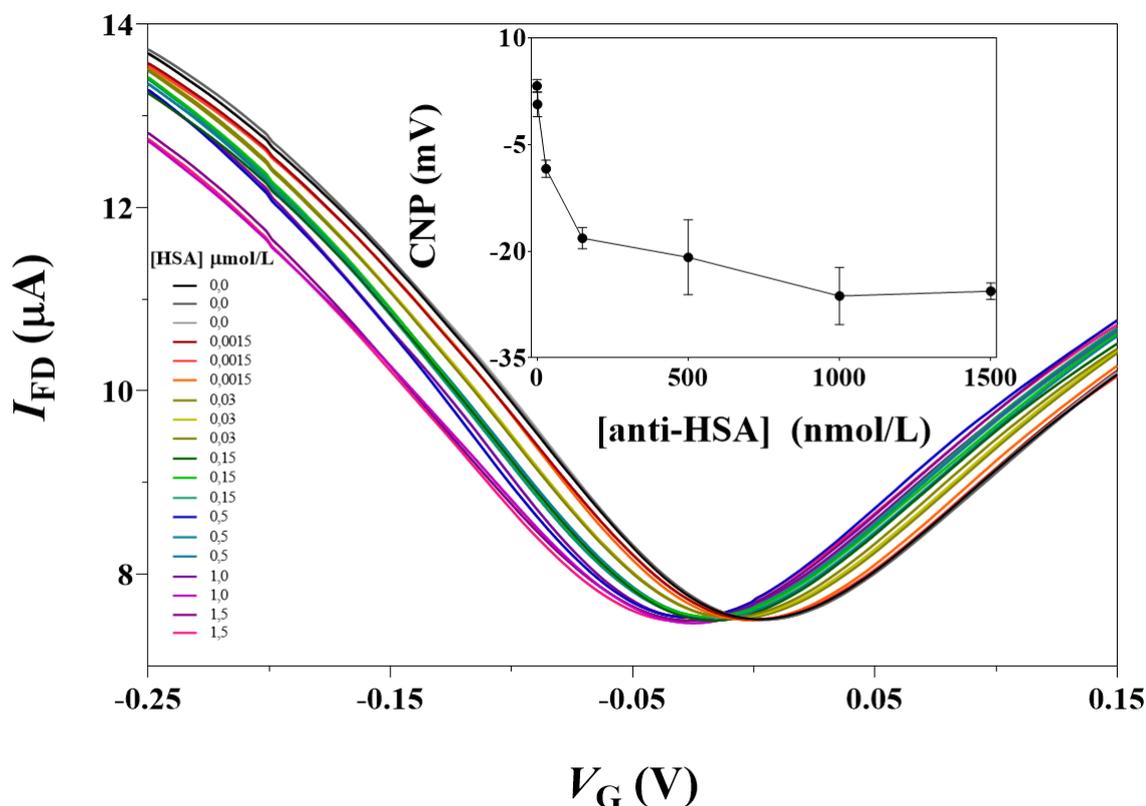
Os resultados obtidos demonstram que o dispositivo foi capaz de detectar a proteína desejada. Entretanto, tal dispositivo não pode ser reutilizado, pois a ligação HSA/anti-HSA não é facilmente desfeita. Observamos que, ao retornar o fluxo de PBS apenas, a corrente não volta a valores iniciais, indicando que este método de lavar não é eficiente. Os sítios de ligação continuam ocupados. Tal observação é importante para salientar a especificidade e seletividade do sistema para a detecção de uma molécula-alvo.

Fizemos, também, medição variando a concentração de HSA, onde com o aumento da concentração de HSA no meio, a voltagem do ponto de Dirac sofreu mudanças na diminuição nos valores de corrente entre fonte e dreno (Figura 35). A razão para este fenômeno de resposta do GFET em função da HSA adicionada pode estar relacionada na diminuição da capacitância da dupla camada na interface do grafeno. Com o aumento de anti-HSA no sistema e a sua ligação à HSA aderida ao grafeno, houve um aumento da resistência elétrica e consequente diminuição da corrente, deslocando

---

o potencial para valores menores. O *inset* da Figura 35 mostra a relação entre a voltagem do eletrodo de *gate* no potencial do ponto de Dirac em função da concentração de HSA no meio. Na figura é possível visualizar que o valor mais baixo de HSA testada, de 1,5 nmol/L, foi capaz de induzir mudanças no ponto de Dirac. Pode-se observar, também, que valores de concentração acima de 1,0  $\mu\text{mol/L}$  ocorre uma estabilização do potencial, provavelmente pela saturação de ligantes na superfície do grafeno.

Podemos deduzir que o GFET produzido pela metodologia de *linker* PBSE se mostrou sensível a imobilização e detecção de HSA e que o sensor pode ser adequado para detectar concentrações abaixo de 1 nmol/L. Esta seletividade é muito importante para uma plataforma de detecção de alta especificidade, não sofrendo grandes alterações na corrente na presença de uma proteína a qual não deveria haver interação entre o anticorpo anti-HSA, mas alterando a corrente na presença do antígeno específico, a HSA.



**Figura 35** – Gráfico de todas as curvas  $I_{FD} \times V_G$  para várias concentrações de anti-HSA adicionadas ao canal de grafeno. As curvas com mesma concentração foram separadas por conjunto de cores, visualizadas quase que sobrepostas. No *inset*, gráfico mostrando o valor do ponto de Dirac com o aumento da concentração de HSA.

#### 4.8 Caracterização da síntese de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Guanina

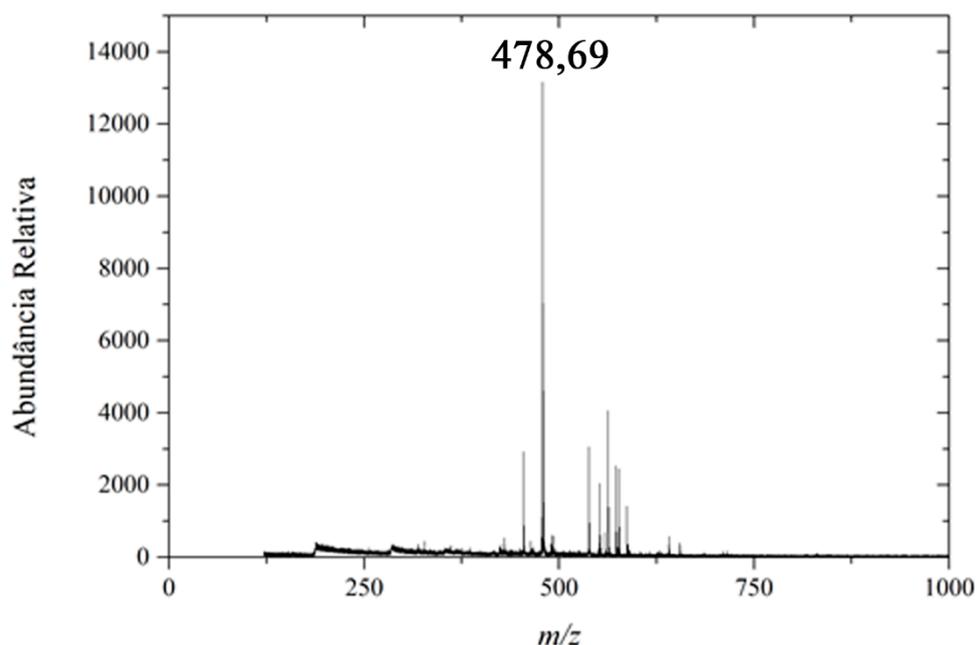
A aflatoxina B<sub>1</sub> conjugada com guanina foi obtida pelo protocolo de Vidyasagar e colaboradores (1997). No processo, alguns produtos secundários são obtidos e podem ser separados por cromatografia do aducto de guanina desejado (VIDYASAGAR; SUJATHA; SASHIDHAR, 1997). A frações iniciais do ensaio de cromatografia (5 a 10 min) que possui estes produtos indesejados presentes na fase líquida, que não tem quantidades suficientes de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, foram separados para teste de especificidade do sistema de medição. Em cromatografia líquida com o uso de uma coluna de fase reversa foi possível extrair e separar o aducto de aflatoxina e identificar a presença de inúmeros intermediários da reação na fase líquida (Figura 36 a). Já na fase orgânica, é possível extrair o aducto AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, juntamente a uma pequena quantidade de dióis de AFB<sub>1</sub>

---

(Figura 36 b). As frações correspondentes ao pico maior foram escolhidas para os testes seguintes e para ensaio em espectrometria de massas.

Ensaio de espectrometria de massas (MALDI-TOF) confirma a presença de um composto com razão massa/carga de 478,69, o que é relativo à AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, na Figura 37, como observado em outros estudos em condições idênticas (MARZILLI *et al.*, 1998). A massa monoisotópica definida do composto aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina é de 479,108 g/mol (NHS, 2019). Há um pequeno aglomerado presente com massa próxima, mas que não puderam ser purificados via cromatografia. É possível que estes compostos sejam oriundos da degradação espontânea de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua em água ou na matriz utilizada para o ensaio, tal como a forma aberta do anel imidazólico da guanina, chamado de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-FAPY (formamidopiridina) (BARAJAS *et al.*, 2017; MARZILLI *et al.*, 1998).



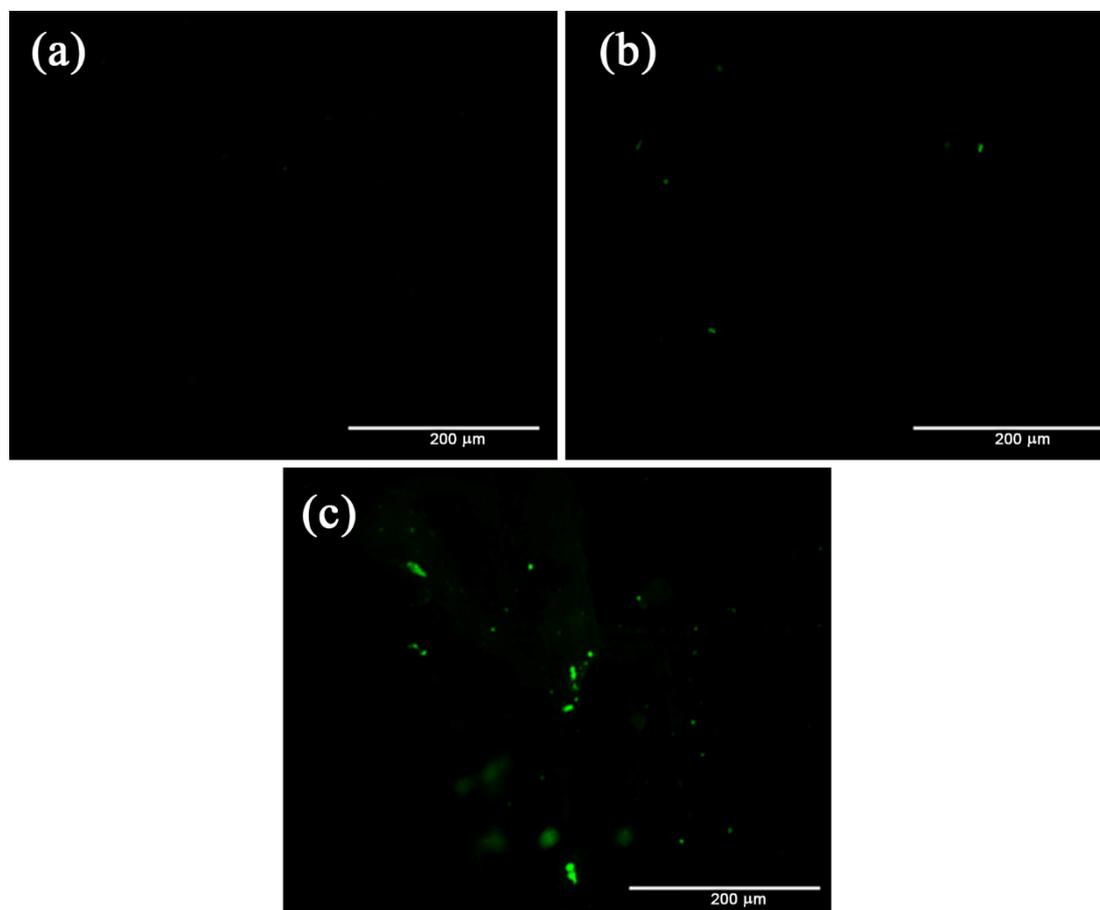


**Figura 37** – Espectrometria de massa da fração orgânica separada de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. Ensaio de MALDI-TOF onde é possível observar composto com  $m/z$  de 478,69, próximo à massa monoisotópica de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua.

#### 4.9 Caracterização óptica do reconhecimento do anticorpo anti-AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua

Um ensaio de microscopia de fluorescência foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade de reconhecimento dos anticorpos adquiridos anti-AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua contra seu antígeno. Neste teste, pequenas amostras de 1 × 1 cm de grafeno foram sensibilizadas com volumes que cobriam toda a superfície deste com diferentes moléculas, todas ligadas diretamente ao grafeno. Em uma primeira amostra, utilizamos 1% de polietilenoglicol 6000, em outra foram adicionadas as frações da cromatografia contendo moléculas secundárias da síntese que não AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua e em outra amostra foi adicionada a fração contendo AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. Em seguida, 50 µg/mL de anticorpos anti-AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram adicionados ao grafeno e lavados com PBS 0,15 mol/L. Como resultado, é possível observar que o bloqueio de PEG se mostra eficiente em impedir a ligação dos anticorpos ao grafeno (Figura 38 a). As frações da fase líquida da cromatografia que não possuíam AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua não reagem de maneira significativa com os anticorpos específicos (Figura 38 b). Porém, ao se realizar o ensaio com a AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua sensibilizada ao grafeno, é possível

perceber a ligação dos anticorpos marcados com FITC e sua distribuição ao longo do grafeno (Figura 38 c).

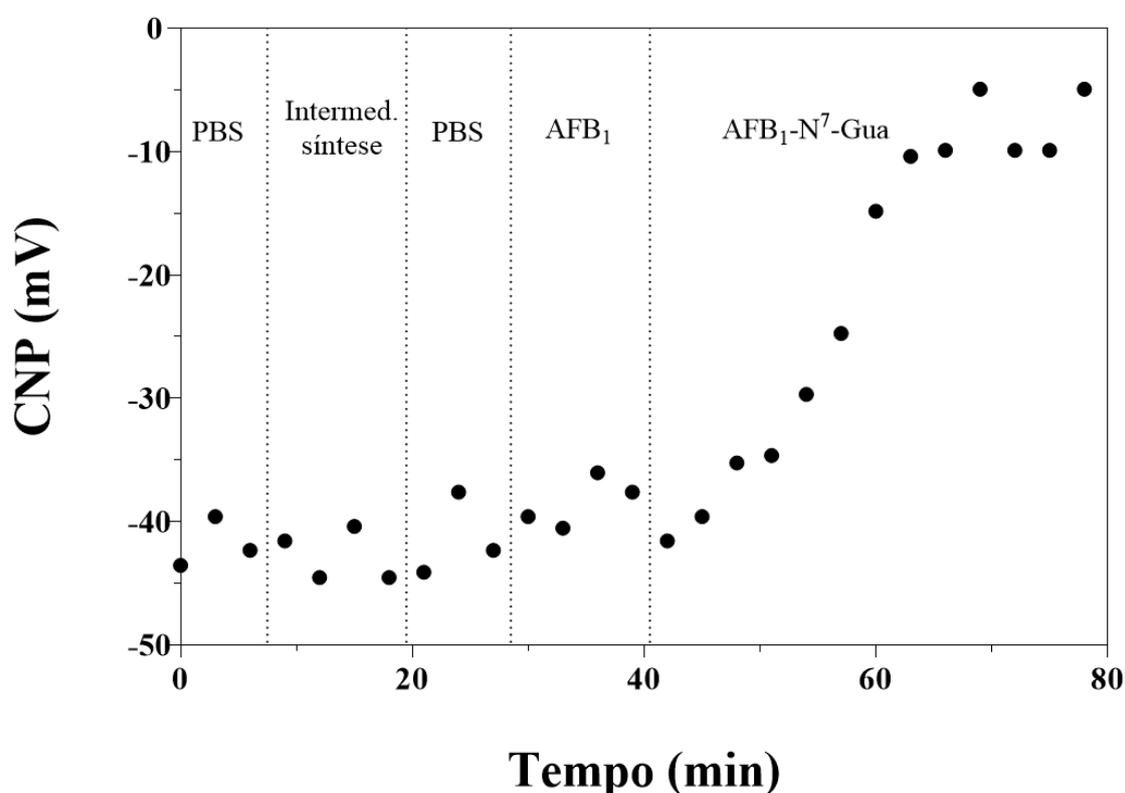


**Figura 38** – Ensaio de microscopia de fluorescência com grafeno CVD na presença de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua e produtos secundários da síntese. Em (a) microscopia de fluorescência com grafeno CVD apenas com bloqueio de PEG-6000. Em (b), grafeno sensibilizado com produtos secundários da síntese de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. Em (c), grafeno sensibilizado com fração cromatográfica com AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua.

#### 4.10 Ensaio de detecção de aflatoxina

Após a determinação que a funcionalização via *molecular crowding*, na secção 4.4, e da sensibilidade dos anticorpos ao antígeno a ser estudado, na secção anterior, realizamos os mesmos procedimentos de imobilização de anticorpos e bloqueio para que, em seguida, realizássemos o imunensaio com AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua.

Para verificar se há detecção da aflatoxina e especificidade almejada, realizamos ensaios com várias curvas  $I_{FD} \times V_{FD}$  intercaladas entre si por um período de três minutos. Foram feitas várias adições de diferentes substâncias que poderiam modificar o sinal e interferir na sensibilidade do grafeno. Foram utilizados o tampão fosfato salino 1,5 mmol/L, subproduto da síntese de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua não identificado retirado da fase orgânica da extração, aflatoxina B<sub>1</sub> e o aducto aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina. Este ensaio realizado ao longo do tempo teve a tensão de canal fixada em 100 mV.



**Figura 39** – Medida ao longo do tempo do ponto de Dirac do sensor de grafeno com a detecção específica de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. Em cada uma das regiões nomeadas significa a medida da curva  $V_G \times I_{FD}$  na presença do analito indicado.

Na Figura 39 são visualizados todos os valores mínimos de corrente para as curvas  $V_G \times I_{FD}$  repetidos durante 80 minutos em que foram inseridos vários componentes a fim de perturbar o sistema e evidenciar uma resposta seletiva. Os intermediários da síntese que foram adicionados não causaram grandes modificações à corrente, visto como os pontos até o minuto 40, quando apenas o conjugado

de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua foi capaz de interagir com o anticorpo específico e modificar as propriedades elétricas do grafeno. Estes intermediário e subprodutos, já descritos, causam mudanças no ambiente químico, mas insuficientes para serem detectadas pelo grafeno. O mecanismo de detecção de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua pode estar relacionado aos efeitos de dopagem por cargas no grafeno quando a molécula se liga ao seu anticorpo e fica dentro do comprimento de Debye.

Para verificar a proporcionalidade entre a resposta do anticorpo com a AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, foi realizado adições de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua com concentrações crescentes ao sistema, sem fluxo e situação estática ao longo do tempo. Com isso fizemos várias curvas de  $V_G \times I_{FD}$  intercaladas pelo espaço de 2 min. Na Figura 40 são observadas as curvas de  $V_G \times I_{FD}$  para várias concentrações adicionadas de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. Quando foram plotados valores de corrente  $I_{FD}$  normalizados pela corrente na concentração de 0 nmol/L ( $\Delta I_{FD}$ ) em função da concentração de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, foi possível visualizar uma linearidade com as concentrações definidas no teste anterior, como visto na Figura 41. Nesta faixa de concentração, a relação do valor mínimo da corrente com a concentração mostra-se linear com um R<sup>2</sup> de 0,948. Ainda que as concentrações utilizadas não fossem muito baixas, este experimento funcionou como piloto para indicar a capacidade de o sistema detectar quantidade pequenas de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua em solução aquosa. Neste perfil linear ainda não foi possível visualizar a saturação dos anticorpos fixados no grafeno e o limite mínimo de detecção do dispositivo.

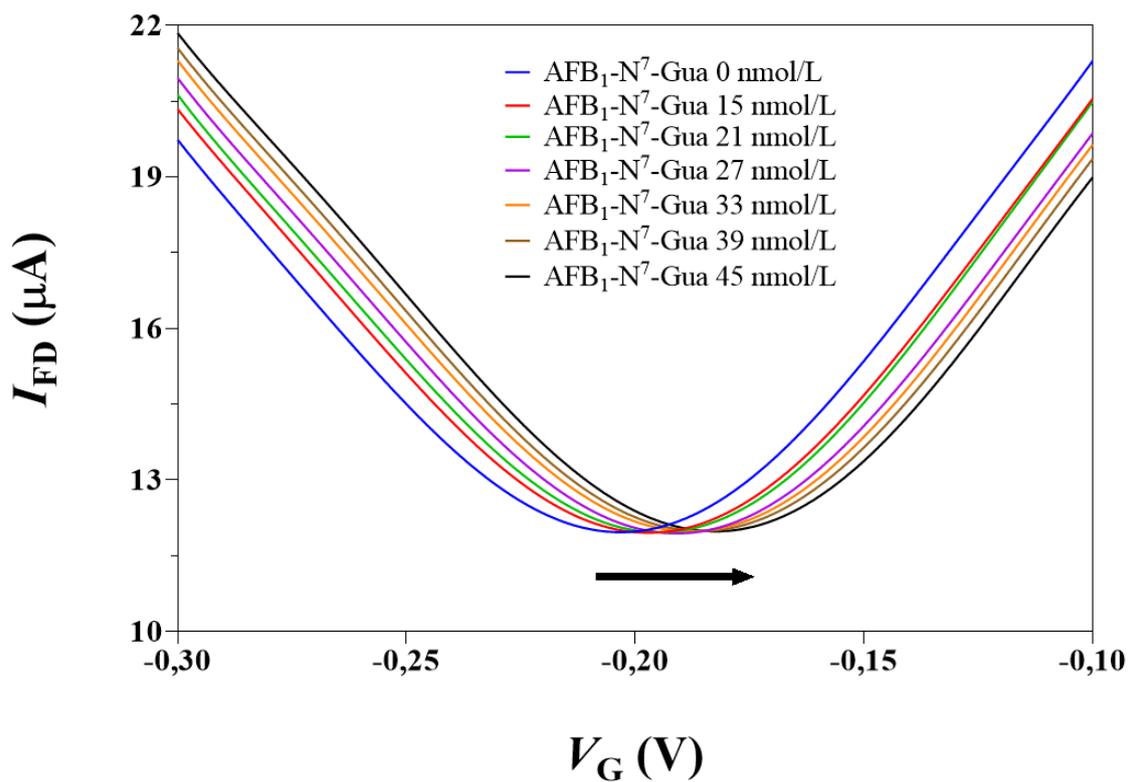


Figura 40 – Curvas curva  $I_{FD} \times V_G$  no chip de grafeno com AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. Concentrações crescentes de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua são observadas da esquerda para a direita. PBS = 10 mmol/L.

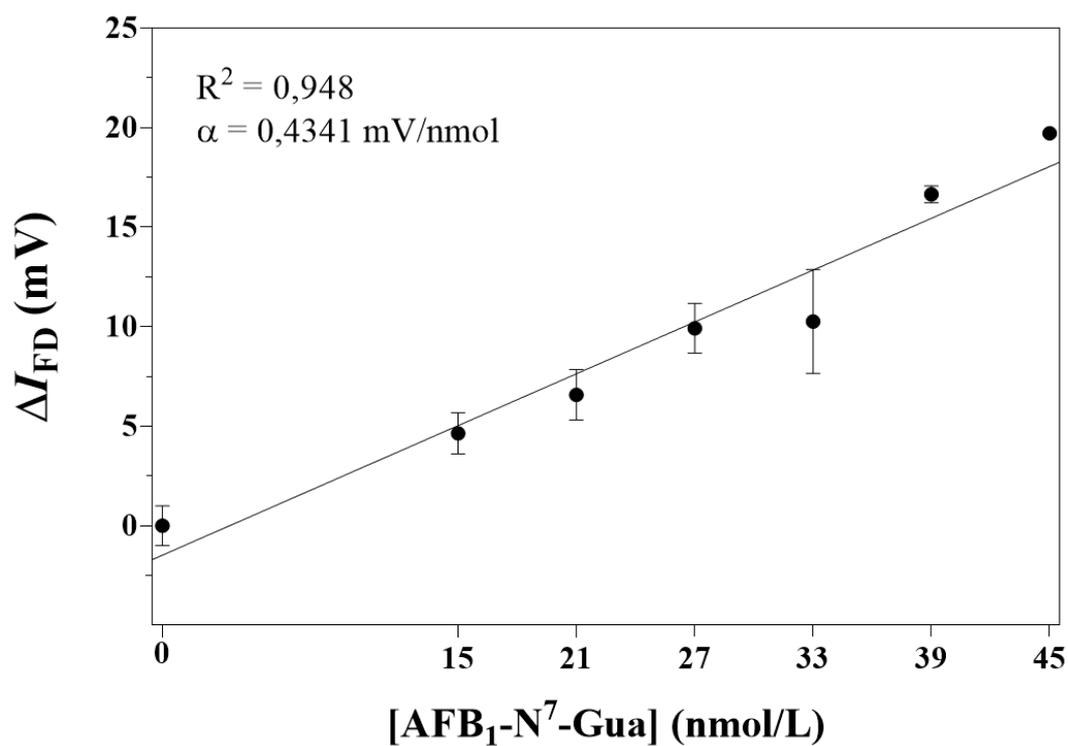


Figura 41 – Relação linear entre concentração de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua e o ponto mínimo de corrente (Ponto de Dirac) para as diferentes concentrações testadas.

Dentro da química analítica, o limite de detecção ( $L_D$ ) é a menor quantidade de uma substância que pode ser distinguida de sua ausência (um valor de branco) com um nível de confiança declarado geralmente 99% (TAYLOR, 1987). Isso significa que  $L_D$  é dependente da imprecisão do processo analítico. O limite de detecção é estimado a partir da média do branco, o desvio padrão do branco e algum fator de confiança. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) publicou o guia EP17 de Protocolo para Determinação de Limites de Quantificação e Detecção (CLSI, 2012). A intenção é definir a menor concentração de um analito que pode ser detectado sem um viés (bias) ou imprecisão do resultado de um ensaio e que pode ser obtida com uma resposta linear.

A maneira mais tradicional de se obter o  $L_D$  consiste em medir replicatas de um calibrador zero ou amostra em branco, determinar o valor médio e o desvio-padrão e calcular o  $L_D$  como a média + 2 desvios-padrões. Variações dessa abordagem utilizam a média + 3 ou 4 ou até 10 desvios-padrões para fornecer um  $L_D$  mais conservador. A fundamentação teórica é que, se o analito estiver presente, ele produzirá algum sinal maior que o ruído analítico, o branco. O ponto fraco desta aproximação é que não há evidência objetiva para provar que uma baixa concentração de analito realmente produzirá um sinal distinguível de uma amostra em branco, i.e., concentração zero (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011). A mesma publicação (CLSI, 2012) define o limite de quantificação ( $L_Q$ ) como a concentração mais baixa na qual o analito pode ser detectado de forma confiável, com a sensibilidade que resulta em um coeficiente de variação de até 20% e é, portanto, uma medida da precisão de um ensaio em níveis baixos de analito (HAY *et al.*, 1991).

Como podemos gerar uma reta com valores de calibração, fizemos uso da determinação dos limites baseado no desvio padrão da resposta e da inclinação da reta de calibração. Essa abordagem é interessante quando o método não exhibe um ruído de fundo, como na análise de pontos discretos de corrente em função da concentração do analito. Neste trabalho,  $L_D$  e  $L_Q$  foram definidos baseados no desvio-padrão da resposta em branco ( $s_{branco}$ ) (LITTLE, 2015). Deste modo, podemos dizer:

$$L_D = 3,3 s_{branco}/\alpha \quad \text{Eq.3}$$

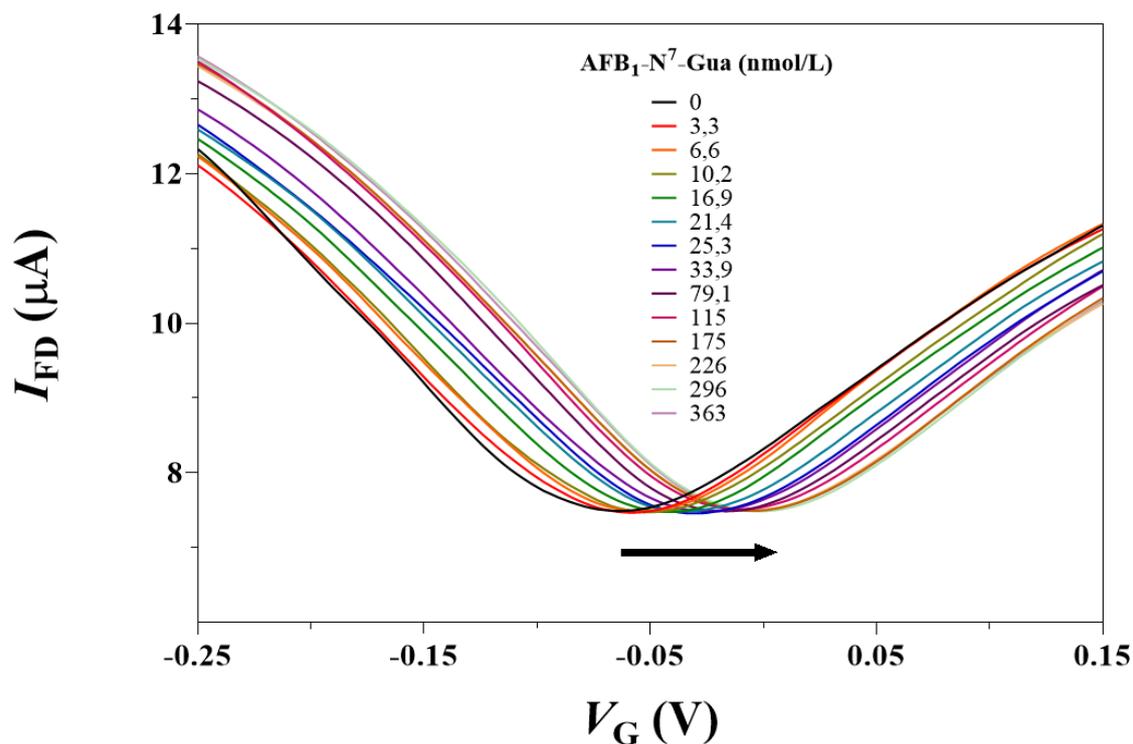
$$L_Q = 10 s_{branco}/\alpha \quad \text{Eq.4}$$

Onde  $\alpha$  é a inclinação da reta ajustada.

Em ensaio posterior, foram adicionadas maiores concentrações para visualização do comportamento do sistema até sua saturação (Figura 42). Também foi realizada sem fluxo e com volume fixo dentro do arcabouço de PDMS. O ponto de corrente mínima obtido das várias curvas de *gate* mostraram um comportamento não-linear até a saturação de todos os anticorpos aderidos ao grafeno (Figura 43). Foi utilizado um modelo de ligação simples para caracterizar a interação entre anticorpo-antígeno obtida por sinal elétrico, de acordo a equação:

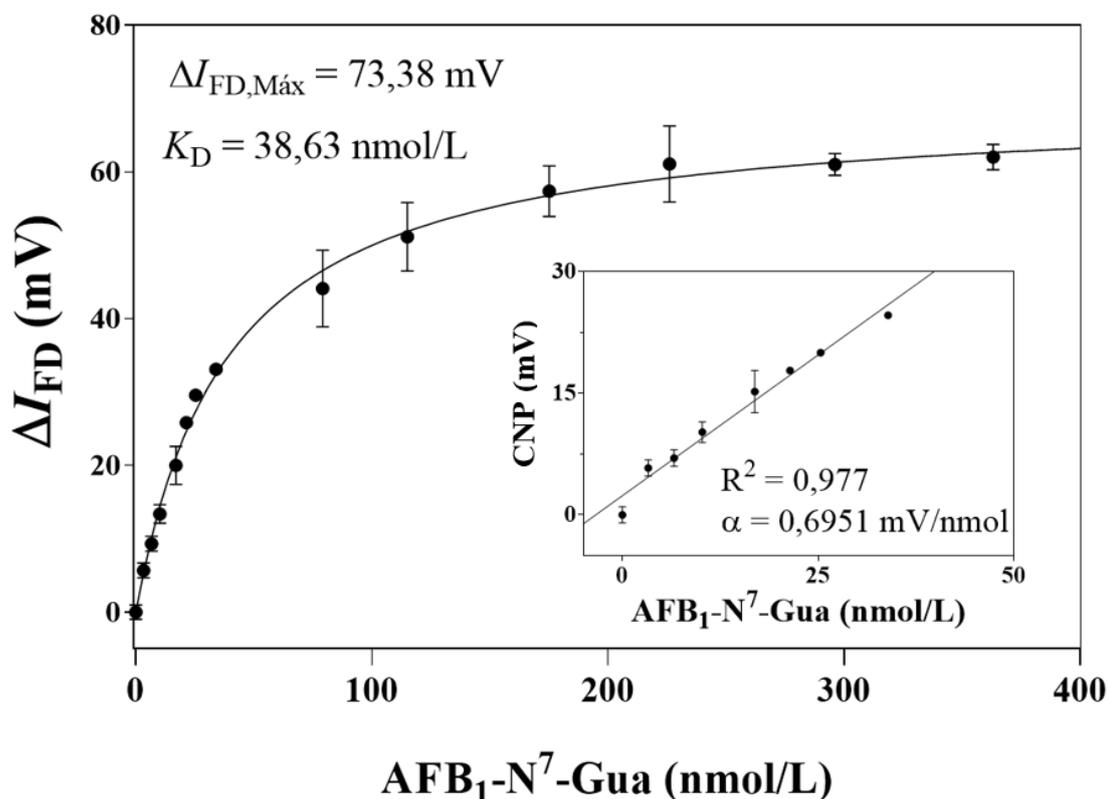
$$\Delta I_{FD} = \frac{\Delta I_{FD,Máx} \times C_{ANG}}{K_D + C_{ANG}} \quad \text{Eq.5}$$

Onde  $\Delta I_{FD,Máx}$  é a corrente na saturação,  $C_{ANG}$  é a concentração de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua e  $K_D$  a constante de dissociação. Neste experimento, a menor concentração utilizada foi de 1,5 nmol/L, porém esta não pode ser diferida da curva de branco, logo não é visualizada na Figura 42. Ao se utilizar a Eq.6, conseguimos visualizar a concentração onde o sistema entre em saturação e a resposta deixa de ser linear (Figura 43).



**Figura 42** – Curvas de  $I_{FD} \times V_G$  de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua obtidas até a saturação do sistema. As concentrações são crescentes da esquerda para a direita.

Pelo gráfico da Figura 43, o sistema começa a saturar a partir de 250 nmol/L de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, com meia-saturação a 68 nmol/L. A diferença entre os pontos de corrente mínima tem valor de 73,38 mV na saturação. A Figura 43 representa a relação entre o valor normalizado do mínimo de corrente e a concentração de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua em que a experiência foi repetida três vezes e os valores médios foram usados. Os dados ilustram uma relação linear dentro da faixa de 0 a 50 nmol/L com  $R^2 = 0,977$ . O limite de detecção de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua foi calculado como definido pelas equações 3 e 4, o que resultou em  $L_D$  de 3,26 nmol/L e  $L_Q$  de 9,88 nmol/L, o que é menor que a concentração recomendada de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua (0,05 ppm ou 0,1 nmol/L) (ABDALLAH; BAZALOU; AL-JULAIIFI, 2012).



**Figura 43** – Curva ajustada da diferença do ponto mínimo de corrente em relação às concentrações de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua. No *inset*, a curva ajustada ao modelo linear para as concentrações iniciais de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua.

A sensibilidade do sensor pode ser definida pela inclinação da reta ajustada característica no intervalo linear, que é de 0,6951 mV/nmol L<sup>-1</sup>. Para concentrações superiores a 50 nmol/L, o biossensor apresenta desvio da linearidade. A afinidade apresentada pelo biossensor pelo analito AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua é interpretada pelo  $K_D$  de 38,63 nmol/L, indicando uma boa afinidade com o analito. O  $K_D$  aparente de anticorpos em geral pelo seu antígeno normalmente abrange os valores de pmol/L (LANDRY *et al.*, 2015). As especificações apresentadas no certificado de análise para o anticorpo comercial utilizado neste trabalho (ThermoFischer® MA1-16885) indicam  $K_D$  entre 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-11</sup> mol/L. O protótipo desenvolvido permite medir níveis de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua nas concentrações de 3,6 a 50 nmol/L, equivalente a 1,77 a 23,9 ng/mL, podendo ser utilizado para analisar fluidos biológicos de mamíferos expostos à aflatoxina B<sub>1</sub>.

Para finalidade de comparação, uma revisão de literatura foi realizada (Tabela). Interessante notar que a maioria dos trabalhos com micotoxinas foca na detecção das substâncias em alimentos, principalmente grãos (EIVAZZADEH-KEIHAN *et al.*, 2017). Vários estudos já demonstraram que a atividade carcinogênica da aflatoxina B<sub>1</sub> está correlacionada com a formação de aductos de DNA formados *in vivo* (PATERSON; LIMA, 2010). Tanto os níveis AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua e aflatoxina B<sub>1</sub>-HSA em urina correlacionam-se bem com a ingestão dietética de aflatoxinas (JAGER *et al.*, 2016).

**Tabela** – Comparativo entre diferentes sensores de aflatoxina em fluidos humanos

<b>Tipo de dispositivo</b>	<b>Analito</b>	<b>Limite de quantificação</b>	<b>Referência</b>
Surface Acoustic Wave (SAW)	AFB <sub>1</sub> -BSA	1,4-12,7 ng/mL	(PUIU <i>et al.</i> , 2015)
Love wave SAW (LW-SAW)	AFB <sub>1</sub> -BSA	1,4-4,8 ng/mL	(PUIU <i>et al.</i> , 2015)
LC-ESI/MS/MS	AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua	0,04-1,25 pg/mL	(EGNER <i>et al.</i> , 2006)
LC-MS	AFB <sub>1</sub> -N <sup>7</sup> -Gua	0,85-1,70 ng/mL	(EDIAGE <i>et al.</i> , 2012)
<b>GFET</b>	<b>AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua</b>	<b>1,7-23,9 ng/mL</b>	<b>Este trabalho</b>

A tabela comparativa mostra que o GFET produzido neste trabalho possui sensibilidade próxima a outros sensores já estudados para AFB<sub>1</sub> apenas (PUIU *et al.*, 2015), porém conjugada com albumina bovina. Métodos cromatográficos e de espectrometria de massas possuem sensibilidade maior, mas são também dispendiosos (EDIAGE *et al.*, 2012; EGNER *et al.*, 2006). Métodos mais recentes utilizam sensores de aptâmeros e outras sondas de DNA para detectar AFB<sub>1</sub>, porém focam apenas na identificação de aflatoxina B<sub>1</sub> presente em sua forma não conjugada (GUO, MANLI *et al.*, 2019; WANG, BIN *et al.*, 2019). Neste trabalho conseguimos utilizar um biossensor capaz de reconhecer AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua em meio aquoso em um dispositivo relativamente barato e de simples produção e manuseio.

## 5 CONCLUSÃO

---

Os níveis de aductos de Aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina podem ser identificados por cromatografia com uma excelente sensibilidade, porém é um método dispendioso financeiramente e exige mão-de-obra qualificada para operação. Um sensor de grafeno com relativa facilidade de produção e manuseio e que é capaz de detectar de forma ultra-sensível o biomarcador de exposição de AFB<sub>1</sub> é uma alternativa viável para os métodos existentes.

A produção por CVD possibilita sintetizar de maneira quase que automatizada grandes áreas de grafeno monocamada grafeno livre de defeitos, confirmado através dos espectros de Raman, microscopias de força atômica e óptica.

Neste trabalho, uma vez a técnica dominada de fotolitografia, foram feitos vários dispositivos do tipo GFET, com relativa facilidade em média escala. Ainda que, dentro do laboratório, um lote de aproximadamente 12 dispositivos consuma, em média, 3 dias para ser finalizado. Isso pode ser minimizado com a utilização de maquinário adequado para fotolitografia em grande escala, tornando o processo muito mais reprodutivo.

Em análises iniciais da tese, forças iônicas mais altas reduziram a sensibilidade do dispositivo. Isso nos forçou a utilizar concentrações menores do PBS nas análises, mas também direcionou o trabalho a evitar *linkers* maiores na sensibilização.

A funcionalização do grafeno CVD com ácido 1-pirenobutanoico éster N-hidroxisuccinimida já não é novidade na literatura. Outros trabalhos já mostram outros acessórios de decoração, como nanopartículas de ouro e proteína A, como âncoras moleculares. É importante ressaltar que após conjugação dos anticorpos ao grafeno utilizando *molecular crowding* sobre os GFETs, o dispositivo se mostrou sensível à detecção de apenas 1,7 ng/mL de AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, mesmo sendo uma concentração baixa. Esta metodologia de aplicação direta de anticorpos sobre o grafeno com auxílio do *linker* PBSE se mostra eficaz e evita a utilização de outras proteínas de ancoragem. Isso torna

---

desnecessário menores concentrações de sais no meio aquoso, uma vez que a sensibilidade do grafeno é proporcional ao comprimento de Debye.

Este modelo de *molecular crowding* como agente de imobilização dos anticorpos permitiu desenvolvimento de um biossensor altamente sensível, mesmo que outros dispositivos tenham sensibilidade ainda maior. Os sensores encontrados na literatura fazem uso de metodologia mais dispendiosas, que não podem ser aplicados em campo ou mesmo não detectam primariamente o aducto de AFB<sub>1</sub> com guanina.

Este trabalho apresenta como perspectivas empregar os sensores GFET para detecção de aflatoxina B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanina em amostras de fluidos humanos, preferencialmente urina, atribuindo confiabilidade no diagnóstico rápido de intoxicação e exposição à aflatoxina B<sub>1</sub>. Como o grafeno CVD é um material obtido em quantidades grandes e uniformes, isso permite que os sensores GFETs sejam produzidos em larga escala como dispositivos descartáveis e de baixo custo. As etapas seguintes seriam os testes em amostras reais e testes de imprecisão e exatidão, assim como a miniaturização do sistema com o objetivo de ser montado como um *point of care* para biomarcadores.

## REFERÊNCIAS

---

- ABDALLAH, Medhat I M; BAZALOU, Mohamed S; AL-JULAIFI, Mohamed Z. Determination of aflatoxin M1 concentrations in full-fat cow's UHT milk sold for consumption in Najran-Saudi regarding its public health significance. *Egyptian Journal of Applied Science*, v. 27, n. 3, p. 40–54, 2012.
- ABERGEL, D S L; APALKOV, V; BERASHEVICH, J; ZIEGLER, Klaus; CHAKRABORTY, Tapash. Properties of graphene: a theoretical perspective. *Advances in Physics*, v. 59, n. 4, p. 261–482, 2010.
- ALMEIDA, Ive Silvestre De. *Estudo Das Alterações Das Propriedades Elétricas e Morfológicas do Grafeno na Presença de Gases, Nanopartículas e Líquidos*. 2013. 181 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2013.
- ANG, Priscilla Kailian; CHEN, Wei; THYE, Andrew; WEE, Shen; LOH, Kian Ping. Solution-Gated Epitaxial Graphene as pH Sensor Solution-Gated Epitaxial Graphene as pH Sensor. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 130, n. October, p. 14392–14393, 2008.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA. *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 7, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011*. . BRASIL: [s.n.]. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC\\_34\\_2014\\_COMP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC_34_2014_COMP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a)>. , 2011
- AOAC. Official methods of analysis. *Association of Analytical Communities*, v. 1, n. Volume 1, p. 141–144, 2000.
- BARAJAS, Jesus F *et al.* Polyketide mimetics yield structural and mechanistic insights into product template domain function in nonreducing polyketide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 21, p. E4142–E4148, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28484029>>.
- BARD, Allen J; FAULKNER, Larry R. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. 2nd. ed. Danvers, MA: John Wiley & Sons, 2001.
- BEDARD, Leanne L.; MASSEY, Thomas E. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, v. 241, n. 2, p. 174–183, 2006.
- BHAVIRIPUDI, Sreekar; JIA, Xiaoting; DRESSELHAUS, Mildred S.; KONG, Jing. Role of Kinetic Factors in Chemical Vapor Deposition Synthesis of Uniform Large Area Graphene Using Copper Catalyst. *Nano Letters*, v. 10, n. 10, p. 4128–4133, 13 out. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl102355e>>.
- BOYD, Matthew; WOOLLEY, Tom. Point of care testing. *Surgery*, v. 34, n. 2, p. 91–93, 2016.
- CARLSON, M. An automated, handheld biosensor for aflatoxin. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 14, n. 10–11, p. 841–848, jan. 2000. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566399000573>>.

CARNAGHAN, R.B.A.; SARGEANT, K. The toxicity of certain ground nut meals to poultry. *Veterinary Record*, v. 73, p. 726–727, 1961.

CASTRO, Luciana De; VARGAS, Eugenia Azevedo. Determining aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in maize using florisil clean up with thin layer chromatography and visual and densitometric quantification. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 115–122, jan. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612001000100024&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000100024&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

CASTRO NETO, A. H.; GUINEA, F.; PERES, N. M R; NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K. The electronic properties of graphene. *Reviews of Modern Physics*, v. 81, n. 1, p. 109–162, 2009.

CHAMES, Patrick; VAN REGENMORTEL, Marc; WEISS, Etienne; BATY, Daniel. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, v. 157, n. 2, p. 220–233, 28 abr. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>>.

CHEN, Robert J.; ZHANG, Yuegang; WANG, Dunwei; DAI, Hongjie. Noncovalent Sidewall Functionalization of Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, n. 16, p. 3838–3839, 2001.

CHOOCHUAY, Sasiprapa; PHAKAM, Jutamas; JALA, Prakorn; MANEEBOON, Thanapoom; TANSAKUL, Natthasit. Determination of Aflatoxin B 1 in Feedstuffs without Clean-Up Step by High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2018, p. 1–8, 24 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijac/2018/4650764/>>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *CLSI EP17-A: Protocols For Determination Of Limits Of Detection And Limits Of Quantitation; Approved Guideline*. [S.l: s.n.], 2012.

COLE, Daniel J.; ANG, Priscilla K.; LOH, Kian Ping. Ion adsorption at the graphene/electrolyte interface. *Journal of Physical Chemistry Letters*, v. 2, n. 14, p. 1799–1803, 2011.

DAI, Yaqi; HUANG, Kunlun; ZHANG, Boyang; ZHU, Liye; XU, Wentao. Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, v. 109, p. 683–689, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.034>>.

DANKERL, Markus *et al.* Graphene Solution-Gated Field-Effect Transistor Array for Sensing Applications. *Advanced Functional Materials*, v. 20, n. 18, p. 3117–3124, 23 set. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/adfm.201000724>>.

DE VOGEL, P.; VAN RHEE, Renée; KOELENMID, W. A. A. Blanche. A Rapid Screening Test for Aflatoxin-synthesizing Aspergilli of the flavus-oryzae Group. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 28, n. 2, p. 213–220, ago. 1965. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1965.tb02145.x>>.

DENG, Jiang; ZHAO, Ling; ZHANG, Ni Ya; KARROW, Niel Alexander; KRUMM, Christopher Steven; QI, De Sheng; SUN, Lv Hui. Aflatoxin B1 metabolism: Regulation by phase I and II

metabolizing enzymes and chemoprotective agents. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 778, p. 79–89, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.10.002>>.

DORNER, J. W.; LAMB, M. C. Development and commercial use of afla-guard®, an aflatoxin biocontrol agent. *Mycotoxin Research*, v. 22, n. 1, p. 33–38, 2006.

EATON, D L; GALLAGHER, E P. Mechanisms of Aflatoxin Carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 34, n. 1, p. 135–172, abr. 1994. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pa.34.040194.001031>>.

EATON, David; GROOPMAN, John. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. 1st. ed. [S.l.]: Academic Press, 1993.

EDIAGE, Emmanuel Njumbe; DIANA DI MAVUNGU, Jose; SONG, Suquan; WU, Aibo; VAN PETEGHEM, Carlos; DE SAEGER, Sarah. A direct assessment of mycotoxin biomarkers in human urine samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 741, p. 58–69, set. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326701200935X>>.

EDWARDS, Rebecca S.; COLEMAN, Karl S. Graphene Film Growth on Polycrystalline Metals. *Accounts of Chemical Research*, v. 46, n. 1, p. 23–30, 15 jan. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar3001266>>.

EGNER, Patricia A.; GROOPMAN, John D.; WANG, Jia-Sheng; KENSLER, Thomas W.; FRIESEN, Marlin D. Quantification of Aflatoxin-B 1 - N 7 -Guanine in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography and Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry 1. *Chemical Research in Toxicology*, v. 19, n. 9, p. 1191–1195, set. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx060108d>>.

EIVAZZADEH-KEIHAN, Reza; PASHAZADEH, Paria; HEJAZI, Maryam; DE LA GUARDIA, Miguel; MOKHTARZADEH, Ahad. Recent advances in Nanomaterial-mediated Bio and immune sensors for detection of aflatoxin in food products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 87, p. 112–128, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616303077>>.

FEDOROV, Maxim V.; KORNYSHEV, Alexei A. Towards understanding the structure and capacitance of electrical double layer in ionic liquids. *Electrochimica Acta*, v. 53, n. 23, p. 6835–6840, 2008.

FERRARI, A. C. *et al.* Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. *Physical Review Letters*, v. 97, n. 18, p. 187401, 30 out. 2006. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.97.187401>>.

FONSECA, Homero. Ocorrência de aflatoxina em farelos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) na região araraquarense, do estado de São Paulo. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, v. 32, n. 0, p. 7–19, 2012.

FU, Wangyang; NEF, Cornelia; KNOPFMACHER, Oren; TARASOV, Alexey; WEISS, Markus; CALAME, Michel; SCHÖNENBERGER, Christian. Graphene Transistors Are Insensitive to pH Changes in Solution. *Nano Letters*, v. 11, n. 9, p. 3597–3600, 14 set. 2011. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl201332c>>.

GALLO, Antonia; SOLFRIZZO, Michele; EPIFANI, Filomena; PANZARINI, Giuseppe; PERRONE, Giancarlo. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, v. 217, p. 162–169, jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301598>>.

GLUSCZAK, Lissandra; DOS SANTOS MIRON, Denise; CRESTANI, Márcia; BRAGA DA FONSECA, Milene; ARAÚJO PEDRON, Fábio De; DUARTE, Marta Frescura; VIEIRA, Vânia Lúcia Pimentel. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 65, n. 2, p. 237–241, 2006.

GROOPMAN, J D; DONAHUE, P R; ZHU, J Q; CHEN, J S; WOGAN, G N. Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82, n. 19, p. 6492–6, out. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3931076>>.

GUO, Beidou; FANG, Liang; ZHANG, Baohong; GONG, Jian Ru. Graphene Doping: A Review. *Insciences Journal*, v. 1, n. 2, p. 80–89, 2011.

GUO, Manli; HOU, Qin; WATERHOUSE, Geoffrey I.N.; HOU, Juying; AI, Shiyun; LI, Xiangyang. A simple aptamer-based fluorescent aflatoxin B1 sensor using humic acid as quencher. *Talanta*, v. 205, p. 120131, dez. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003991401930757X>>.

GURBAN, Ana-Maria; EPURE, Petru; OANCEA, Florin; DONI, Mihaela. Achievements and Prospects in Electrochemical-Based Biosensing Platforms for Aflatoxin M1 Detection in Milk and Dairy Products. *Sensors*, v. 17, n. 12, p. 2951, 19 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/17/12/2951>>.

HALKIAS, Christos C.; MILLMAN, Jacob; JIT, Satyabrata. *Millman's Electronic Devices and Circuits*. 3rd. ed. [S.l.]: McGraw-Hill, 2010.

HAY, I D; BAYER, M F; KAPLAN, M M; KLEE, G G; LARSEN, P R; SPENCER, C A. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. The Committee on Nomenclature of the American Thyroid Association. *Clinical chemistry*, v. 37, n. 11, p. 2002–8, nov. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1934479>>.

HESS, Lucas Heinrich. Graphene Transistors for Biosensing and Bioelectronics. *Proceedings of the IEEE*, v. 101, n. 7, p. 1780–1792, 2013.

HORN, Gabriele; DE KONING, Martijn Constantijn; VAN GROL, Marco; THIERMANN, Horst; WOREK, Franz. Interactions between acetylcholinesterase, toxic organophosphorus compounds and a short series of structurally related non-oxime reactivators: Analysis of reactivation and inhibition kinetics in vitro. *Toxicology Letters*, v. 299, p. 218–225, dez. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427418317193>>.

- IARC. *No Title*. Disponível em: <<http://publications.iarc.fr/>>. Acesso em: 9 mar. 2019.
- IQBAL, S.Z.; JINAP, S.; PIROUZ, A.A.; AHMAD FAIZAL, A.R. Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 46, n. 1, p. 110–119, nov. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415001983>>.
- IQBAL, Shahzad Zafar; NISAR, Sonia; ASI, Muhammad Rafique; JINAP, S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control*, v. 43, p. 98–103, set. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514001169>>.
- IUPAC. *Glossary for Chemists of Terms Used in Biotechnology (IUPAC Recommendations 1992)*. . [S.l.]: APPLIED CHEMISTRY DIVISION COMMISSION ON BIOTECHNOLOGY. , 1992
- JAGER, Alessandra V.; TONIN, Fernando G.; BAPTISTA, Gabriela Z.; SOUTO, Pollyana C.M.C.; OLIVEIRA, Carlos A.F. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 219, n. 3, p. 294–300, maio 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438463915001601>>.
- JUSTINO, Celine I.L.; GOMES, Ana R.; FREITAS, Ana C.; DUARTE, Armando C.; ROCHA-SANTOS, Teresa A.P. Graphene based sensors and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 91, p. 53–66, jun. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993617300031>>.
- KHATAYEVICH, Dmitriy; PAGE, Tamon; GRESSWELL, Carolyn; HAYAMIZU, Yuhei; GRADY, William; SARIKAYA, Mehmet. Selective detection of target proteins by peptide-enabled graphene biosensor. *Small*, v. 10, n. 8, p. 1505–1513, 2014.
- KIM, Keun Soo *et al.* Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature*, v. 457, n. 7230, p. 706–10, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145232>>.
- KISELEV, M A; GRYZUNOV, Iu A; DOBRETSOV, G E; KOMAROVA, M N. [Size of a human serum albumin molecule in solution]. *Biofizika*, v. 46, n. 3, p. 423–7, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449540>>.
- KRAGH-HANSEN, Ulrich. Molecular Aspects of Ligand to Serum Albumin. *Pharmacology*, v. 33, n. 1, p. 16–53, 1981.
- KUDIN, Konstantin N.; CAR, Roberto. Why are water-hydrophobic interfaces charged? *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 12, p. 3915–3919, 2008.
- KWANG-SEOK YUN; EUISIK YOON. Microfabrication of 3-dimensional photoresist structures using selective patterning and development on two types of specific resists and its application to microfluidic components. 2004, [S.l.]: IEEE, 2004. p. 757–760. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/1290695/>>.
- LANDRY, J.P.; KE, Yaohuang; YU, Guo-Liang; ZHU, X.D. Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *Journal*

of *Immunological Methods*, v. 417, p. 86–96, fev. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175914003640>>.

LEADON, S A; TYRRELL, R M; CERUTTI, P A. Excision repair of aflatoxin B1-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer research*, v. 41, n. 12 Pt 1, p. 5125–9, dez. 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6796265>>.

LEE, E. A.; ZIMMERMAN, L. R.; BHULLAR, B. S.; THURMAN, E. M. Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 19, p. 4937–4943, 2002.

LI, X. *et al.* Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils. *Science*, v. 324, n. 5932, p. 1312–1314, 5 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1171245>>.

LITTLE, Thomas A. Method Validation Essentials, Limit of Blank, Limit of Detection, and Limit of Quantitation. *BioPharm International*, v. 28, n. 4, 2015.

MALARD, L.M.; PIMENTA, M.A.; DRESSELHAUS, G.; DRESSELHAUS, M.S. Raman spectroscopy in graphene. *Physics Reports*, v. 473, n. 5–6, p. 51–87, abr. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0370157309000520>>.

MALASPINA, David C.; LONGO, Gabriel; SZLEIFER, Igal. Behavior of ligand binding assays with crowded surfaces: Molecular model of antigen capture by antibody-conjugated nanoparticles. *PLOS ONE*, v. 12, n. 9, p. e0185518, 28 set. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0185518>>.

MARZILLI, Lisa A; WANG, David; KOBERTZ, William R; ESSIGMANN, John M; VOUIROS, Paul. Mass spectral identification and positional mapping of aflatoxin B1-guanine adducts in oligonucleotides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 9, n. 7, p. 676–682, jul. 1998. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1016/S1044-0305\(98\)00039-7](http://link.springer.com/10.1016/S1044-0305(98)00039-7)>.

MATABARO, Emmanuel; ISHIMWE, Nestor; UWIMBABAZI, Eric; LEE, Byong H. Current Immunoassay Methods for the Rapid Detection of Aflatoxin in Milk and Dairy Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, n. 5, p. 808–820, set. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12287>>.

MATSUMOTO, Kazuhiko; MAHASHI, Kenzo; OHNO, Yasuhide; INOUE, Koichi. Recent advances in functional graphene biosensors. *J. Phys. D: Appl. Phys. Journal of Physics D: Applied Physics J. Phys. D: Appl. Phys.*, v. 47, n. 47, p. 94005–6, 2014.

MEIRELES, Leonel Muniz. *Estudo e Aplicação do Grafeno como Biossensor*. 2016. 86 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2016.

MENÉNDEZ-HELMAN, Renata J.; FERREYROA, Gisele V.; DOS SANTOS AFONSO, Maria; SALIBIÁN, Alfredo. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 88, n. 1, p. 6–9, 2012.

MINOT, Ethan D.; JANSSENS, Anne M.; HELLER, Iddo; HEERING, Hendrik A.; DEKKER, Cees; LEMAY, Serge G. Carbon nanotube biosensors: The critical role of the reference electrode. *Applied*

*Physics Letters*, v. 91, n. 9, p. 093507, 27 ago. 2007. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.2775090>>.

MITCHELL, Nicole J.; BOWERS, Erin; HURBURGH, Charles; WU, Felicia. Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 33, n. 3, p. 540–550, 3 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2016.1138545>>.

MOHAJERI, Mohammad; BEHNAM, Behzad; CICERO, Arrigo F. G.; SAHEBKAR, Amirhossein. Protective effects of curcumin against aflatoxicosis: A comprehensive review. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 4, p. 3552–3577, abr. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.26212>>.

MONSON, Melissa; COULOMBE, Roger; REED, Kent. Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. *Agriculture*, v. 5, n. 3, p. 742–777, 8 set. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2077-0472/5/3/742>>.

MUNZ, Martin; GIUSCA, Cristina E.; MYERS-WARD, Rachael L.; GASKILL, D. Kurt; KAZAKOVA, Olga. Thickness-Dependent Hydrophobicity of Epitaxial Graphene. *ACS Nano*, v. 9, n. 8, p. 8401–8411, 2015.

NESBITT, BRENDA F.; O’KELLY, J.; SARGEANT, K.; SHERIDAN, ANN. Aspergillus Flavus and Turkey X Disease: Toxic Metabolites of Aspergillus flavus. *Nature*, v. 195, n. 4846, p. 1062–1063, set. 1962. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1951062a0>>.

NHS (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). *XIOUDSNTNJJNQGMHKTTRSSA-N*, CID=135562701. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135562701>>. Acesso em: 14 abr. 2019.

NOVOSELOV, K S *et al.* Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature*, v. 438, n. 7065, p. 197–200, 2005.

OHNO, Yasuhide; MAEHASHI, Kenzo; YAMASHIRO, Yusuke; MATSUMOTO, Kazuhiko. Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors for Detection pH and Protein Adsorption. *Nano Lett.*, v. 9, n. 9, p. 3318–3322, 2009.

OKAMOTO, Shogo; OHNO, Yasuhide; MAEHASHI, Kenzo; INOUE, Koichi; MATSUMOTO, Kazuhiko. Immunosensors based on graphene field-effect transistors fabricated using antigen-binding fragment. *Japanese Journal of Applied Physics*, v. 51, n. 6 PART 2, 2012.

OUELLETTE, Lisa Larrimore. *Chemical and biological sensing with carbon nanotubes in solution*. 2008. 223 f. Cornell University, Ithaca, 2008.

PANKAJ, S.K.; SHI, Hu; KEENER, Kevin M. A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends in Food Science & Technology*, v. 71, p. 73–83, jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441730033X>>.

PATERSON, Robert R M; LIMA, Nelson. Toxicology of mycotoxins. *EXS*, v. 100, p. 31–63, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20358681>>.

- PERES, N. M. R. Colloquium : The transport properties of graphene: An introduction. *Reviews of Modern Physics*, v. 82, n. 3, p. 2673–2700, 15 set. 2010. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/RevModPhys.82.2673>>.
- PERES, N. M.R. Graphene, new physics in two dimensions. *Europhysics News*, v. 40, n. 3, p. 17–20, 2009.
- PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 12, p. 3964–3967, 1 dez. 1992. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/70/12/3964-3967/4632087>>.
- POPOV, V N. 2D Raman band of single-layer and bilayer graphene. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 682, p. 012013, 9 fev. 2016. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1742-6596/682/i=1/a=012013?key=crossref.c54636138e4d3e292fa6a4fb4c51e2b8>>.
- PRADO, Guilherme. CONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS POR MICOTOXINAS NO BRASIL E NO MUNDO. *REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA DO SUS/MG*, v. 2, n. 2, p. 13–26, 2017.
- PUIU, Mihaela; GURBAN, Ana-Maria; ROTARIU, Lucian; BRAJNICOV, Simona; VIESPE, Cristian; BALA, Camelia. Enhanced Sensitive Love Wave Surface Acoustic Wave Sensor Designed for Immunoassay Formats. *Sensors*, v. 15, n. 5, p. 10511–10525, 5 maio 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/15/5/10511>>.
- PUMERA, Martin. Graphene in biosensing. *Materials Today*, v. 14, n. 7–8, p. 308–315, 2011.
- PUTZ, Mihai V.; LACRAMA, Ana-Maria; OSTAFE, Vasile. Full Analytic Progress Curves of Enzymic Reactions in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 7, n. 11, p. 469–484, 2006.
- RAWAL, Sumit; KIM, Ji Eun; COULOMBE, Roger. Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, v. 89, n. 3, p. 325–331, dez. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528810001116>>.
- REICH, S; THOMEN, C; MAULTZSCH, J. *Carbon Nanotubes: Basic Concepts and Physical Properties*. 1st. ed. [S.l.]: WILEY-VCH, 2004.
- RISTEIN, Jürgen; ZHANG, Wenying; SPECK, Florian; OSTLER, Markus; LEY, Lothar; SEYLLER, Thomas. Characteristics of solution gated field effect transistors on the basis of epitaxial graphene on silicon carbide. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 43, n. 34, p. 345303, 2010.
- SAHA, Bedabrata; EVERS, Toon H.; PRINS, Menno W. J. How Antibody Surface Coverage on Nanoparticles Determines the Activity and Kinetics of Antigen Capturing for Biosensing. *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 16, p. 8158–8166, 19 ago. 2014. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac501536z>>.
- SCHWIERZ, F. Graphene transistors. *Nature Nanotechnology*, v. 5, n. 7, p. 487–496, 2010.
- SELVARAJAN, Reena Sri; HAMZAH, Azrul Azlan; MAJLIS, Burhanuddin Yeop. Transfer characteristics of graphene based field effect transistor (GFET) for biosensing application. ago. 2017, [S.l.]: IEEE, ago. 2017. p. 88–91. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/8069127/>>.

SHIM, Jihye; LUI, Chun Hung; KO, Taeg Yeoung; YU, Young-Jun; KIM, Philip; HEINZ, Tony F.; RYU, Sunmin. Water-Gated Charge Doping of Graphene Induced by Mica Substrates. *Nano Letters*, v. 12, n. 2, p. 648–654, 8 fev. 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl2034317>>.

SHRIVASTAVA, Alankar; GUPTA, VipinB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, v. 2, n. 1, p. 21, 2011. Disponível em: <<http://www.cysonline.org/text.asp?2011/2/1/21/79345>>.

SOHN, Il Yung; KIM, Duck Jin; JUNG, Jin Heak; YOON, Ok Ja; NGUYEN THANH, Tien; TRAN QUANG, Trung; LEE, Nae Eung. PH sensing characteristics and biosensing application of solution-gated reduced graphene oxide field-effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 45, n. 1, p. 70–76, 2013.

STRAKOSAS, Xenofon; BONGO, Manuelle; OWENS, Roisín M. The organic electrochemical transistor for biological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 15, p. 1–14, 2015.

SUN, Jie *et al.* Electrochemical Bubbling Transfer of Graphene Using a Polymer Support with Encapsulated Air Gap as Permeation Stopping Layer. *Journal of Nanomaterials*, v. 2016, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jnm/2016/7024246/>>.

SUZUKI, Satoru. *Physical and Chemical Properties of Carbon Nanotubes*. [S.l.]: InTech, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/physical-and-chemical-properties-of-carbon-nanotubes>>.

TAYLOR, John Keenan. *Quality Assurance of Chemical Measurements*. 1 st ed. New York: Routledge, 1987. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9781351420747>>.

TULAYAKUL, P.; SAKUDA, S.; DONG, K.S.; KUMAGAI, S. Comparative activities of glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B1 in livers of experimental and farm animals. *Toxicon*, v. 46, n. 2, p. 204–209, ago. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010105001340>>.

TURNER, Anthony P.F. *Biosensors: Fundamentals and applications*. 1st. ed. Oxford: Oxford University Press, 1987. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314008252>>.

UDOMKUN, Patchimaporn; WIREDU, Alexander Nimo; NAGLE, Marcus; BANDYOPADHYAY, Ranajit; MÜLLER, Joachim; VANLAUWE, Bernard. Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook. *Food Control*, v. 72, p. 110–122, fev. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516304091>>.

VERHEECKE, C.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F. Microbial degradation of aflatoxin B1: Current status and future advances. *International Journal of Food Microbiology*, v. 237, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.028>>.

VIDYASAGAR, T.; SUJATHA, N.; SASHIDHAR, R. B. Direct synthesis of aflatoxin B1-N7 guanine adduct: A reference standard for biological monitoring of dietary aflatoxin exposure in molecular epidemiological studies. *Food Additives and Contaminants*, v. 14, n. 5, p. 457–467, 1997.

- VIEGAS, Susana; VEIGA, Luísa; ALMEIDA, Ana; DOS SANTOS, Mateus; CAROLINO, Elisabete; VIEGAS, Carla. Occupational Exposure to Aflatoxin B1 in a Portuguese Poultry Slaughterhouse. *Annals of Occupational Hygiene*, v. 60, n. 2, p. 176–183, mar. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/annweh/article-lookup/doi/10.1093/annhyg/mev077>>.
- WANG, Bin; ZHENG, Jiushang; DING, Ailing; XU, Liquan; CHEN, Jiuncun; LI, Chang Ming. Highly sensitive aflatoxin B1 sensor based on DNA-guided assembly of fluorescent probe and TdT-assisted DNA polymerization. *Food Chemistry*, v. 294, p. 19–26, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814619308209>>.
- WANG, Shi-Qing; HUANG, Guo-Qing; LI, Yu-Peng; XIAO, Jun-Xia; ZHANG, Yan; JIANG, Wen-Li. Degradation of aflatoxin B1 by low-temperature radio frequency plasma and degradation product elucidation. *European Food Research and Technology*, v. 241, n. 1, p. 103–113, 27 jul. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00217-015-2439-5>>.
- WARBURTON, Marilyn L.; WILLIAMS, W. Paul. Aflatoxin Resistance in Maize: What Have We Learned Lately? *Advances in Botany*, v. 2014, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/archive/2014/352831/>>.
- WILLIAMS, Jonathan H; PHILLIPS, Timothy D; JOLLY, Pauline E; STILES, Jonathan K; JOLLY, Curtis M; AGGARWAL, Deepak. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition*, v. 80, n. 5, p. 1106–22, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531656>>.
- WOJCIK, Peter M. *Fabrication and Characterization of a Label Free Graphene Field Effect Transistor Biosensor*. 2012. 57 f. Oregon State University, Corvallis - OR, 2012.
- XIA, Fengnian; PEREBEINOS, Vasili; LIN, Yu-ming; WU, Yanqing; AVOURIS, Phaedon. The origins and limits of metal–graphene junction resistance. *Nature Nanotechnology*, v. 6, n. 3, p. 179–184, 6 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nnano.2011.6>>.
- YU, Jiujiang. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, v. 4, n. 11, p. 1024–1057, 25 out. 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/4/11/1024>>.
- ZANGI, Ronen; ENGBERTS, Jan B F N. Physisorption of hydroxide ions from aqueous solution to a hydrophobic surface. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 7, p. 2272–2276, 2005.
- ZHAO, Zheyuan; MATSUI, Hiroshi. Accurate Immobilization of Antibody-Functionalized Peptide Nanotubes on Protein-Patterned Arrays by Optimizing their Ligand–Receptor Interactions. *Small*, v. 3, n. 8, p. 1390–1393, 3 ago. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200700006>>.
- ZHONG, Yu Lin; TIAN, Zhiming; SIMON, George P.; LI, Dan. Scalable production of graphene via wet chemistry: Progress and challenges. *Materials Today*, v. 18, n. 2, p. 73–78, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2014.08.019>>.
- ZHU, Yanwu; MURALI, Shanthi; CAI, Weiwei; LI, Xuesong; SUK, Ji Won; POTTS, Jeffrey R.; RUOFF, Rodney S. Graphene and graphene oxide: Synthesis, properties, and applications. *Advanced Materials*, v. 22, n. 35, p. 3906–3924, 2010.