

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

KASSIA AYUMI SEGAWA DO AMARAL

**BIOSENSORES PARA AFLATOXINAS COM EMPREGO DE APTÂMEROS: UMA
ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA**

DOIS VIZINHOS

2024

KASSIA AYUMI SEGAWA DO AMARAL

**BIOSENSORES PARA AFLATOXINAS COM EMPREGO DE APTÂMEROS: UMA
ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA**

Biosensors for aflatoxins employing aptamers; a scientometric analysis

Trabalho de conclusão de curso de Especialização apresentado como requisito para obtenção do título de Especialização em Biologia Molecular – Habilitação Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Dra Maristela dos Santos Rey.

DOIS VIZINHOS



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

KASSIA AYUMI SEGAWA DO AMARAL

**BIOSENSORES PARA AFLATOXINAS COM EMPREGO DE APTÂMEROS: UMA
ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização
apresentado como requisito para obtenção do título
de Especialista em Biologia Molecular – Habilitação
Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal
do Paraná (UTFPR).

05 de abril/2024

Maristela dos Santos Rey
Doutorado em Fitossanidade
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos

André Roberto Ortoncelli
Doutorado em Informática
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos

Thiago Cacção Villa
Mestrado em Agroecossistemas
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos

DOIS VIZINHOS

2024

Dedico este trabalho à minha família, Arnaldo, Luiz
Felipe Kenji e Arthur Kenzo, aos meus pais Osamu e
Akemi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Maristela dos Santos Rey pelo comprometimento e prontidão.

Agradeço a André Roberto Ortoncelli e Thiago Cacção Villa por comporem a minha banca e contribuírem no resultado desta.

Agradeço aos mestres por compartilharem seus saberes e nos mostrarem um mundo novo magnífico.

Aos colegas de turma pelo estímulo e companhia nesta jornada.

À minha família pelo apoio.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por proporcionar o aperfeiçoamento profissional e pessoal.

A todos que tiveram parte nesta conquista e não foram nominados.

RESUMO

Os prejuízos causados pela contaminação de alimentos e *commodities* por aflatoxinas não é apenas no âmbito econômico, mas principalmente de saúde pública, uma vez que já foi comprovada sua carcinogenicidade; o fato haver legislações em vários países estabelecendo limites máximos permitidos em alimentos e rações, mostra sua importância. As ferramentas moleculares são inovadoras neste tema, com estudos acerca da especificidade e sensibilidade de aptâmeros, tempo de análise reduzido e desenvolvimento de biossensores. Este estudo de cienciometria retrata no tempo o estado da arte desde os seus primórdios de 2012 até 2023. A bioinformática auxilia no tratamento dos dados gerados pelas ciências ômicas, fornecendo meios capazes de buscar, ordenar e comparar essas informações de forma rápida apresentando-os de forma ordenada de acordo com o interesse do usuário; uma de suas ferramentas, a Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX) também conhecido por seleção *in vitro* ou evolução *in vitro* tem papel relevante no *design* de aptâmeros. A busca por tecnologias que forneçam evidências precoces da presença do fungo aflatoxigênico ou de algum intermediário da biossíntese de aflatoxinas ainda no campo, durante o armazenamento ou no processamento seria um grande passo para a segurança alimentar. Verificou-se que ainda são necessários investimentos na área para que seja desenvolvida uma metodologia que tenha os seguintes atributos: sensível, específica, portátil e de baixo custo; constatou-se também que o interesse neste tema ainda continua em destaque, visto a produção científica localizada no portal da Capes e na base Web of Science.

Palavras-chave: metabólitos secundários; micotoxinas; oligonucleotídeos; aptasensores; cienciometria; SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial).

ABSTRACT

The damages caused by food and commodity contamination by aflatoxins are not only economic but primarily public health-related, given that their carcinogenicity has been proven. The existence of legislation in various countries establishing maximum permitted limits in food and feed underscores their importance. Molecular tools are innovative in this field, with studies focusing on aptamers specificity and sensitivity, reduced analysis time, and biosensor development. This scientometric study portrays the state of the art over time from its beginnings in 2012 to 2023. Bioinformatics aids in processing data generated by omics sciences, providing means to swiftly search, organize, and compare this information in an orderly manner according to the user's interest. One of its tools, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX), also known as *in vitro* selection or *in vitro* evolution, plays a significant role in aptamer design. The pursuit of technologies that provide early evidence of aflatoxigenic fungus presence or any intermediaries of aflatoxin biosynthesis in the field, during storage, or processing would be a significant step for food safety. It was found that investments in the area are still necessary to develop a methodology with the following attributes: sensitive, specific, portable, and low-cost. Furthermore, it was noted that interest in this topic remains prominent, as evidenced by scientific production located in the Capes portal and the Web of Science database.

Keywords: secondary metabolites; mycotoxins; oligonucleotides; aptasensors; scientometrics; SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - - Estrutura química das aflatoxinas e fungos produtores	14
Figura 2 - Linha do tempo da descoberta da AF	17
Figura 3 - Via biossintética das AFs elucidada até o momento	18
Figura 4 - Clusters das AFs.....	19
Figura 5 - Processo de degradação biológica da aflatoxina	26
Figura 6 - Mecanismo de genotoxicidade, toxicidade aguda e imunotoxicidade	26
Figura 7 - Marcadores moleculares da AFB ₁	27
Figura 8 - PRISMA 2009 Flow Diagram	32
Figura 9 - Citações e publicações ao longo do tempo.....	34
Figura 10 - Principais categorias de citações MESO	34
Figura 11 - Países que mais publicaram no tema	35
Figura 12 - Top 10 autores que mais publicaram no tema	35
Figura 13 - Principais palavras-chave do estudo.....	37
Figura 14 - Linha do tempo do tema pesquisado	38
Figura 15 - Processo da Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX).....	39
Figura 16 - Ligação da AFB ₁ ao aptâmero	40
Figura 17 - Diagrama esquemático de aptasensor eletroquímico.	41
Figura 18 - Fenômeno de luminescência.	42
Figura 19 - Fundamentos do Förster resonance energy transfer (FRET)	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Métodos cromatográficos e detectores utilizados para aflatoxinas	22
Quadro 2 - Métodos baseados em anticorpos e aptâmeros.....	23
Quadro 3 - Limites máximos permitidos em alimentos.....	29
Quadro 4 - Limites máximos permitidos em commodities para ração animal.....	30
Quadro 5 - Top 10 artigos mais citados	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFB ₃	Parasiticol
AFBO	Aflatoxina B ₁ exo-8,9-epóxido
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFL _I	Aflatoxicol I
AFL _{II}	Aflatoxicol II
AFLM ₁	Aflatoxicol M ₁
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
AFs	Aflatoxinas
AHR	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i>
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CELISA	Cellular/complement-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
COX-2	Ciclooxygenase-2
CYP450	Enzimas microssomais citocrômicas
DAD	<i>Diode array detector</i>
ELIME	<i>Enzyme Linked ImmunoMagnetic Electrochemical-array</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESI	<i>Electrospray ion source</i>
FD	<i>Fluorescence detector</i>
FLISA	<i>Fluorescence-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL	Interleucina
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
K _d	Constante de dissociação
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LIF	<i>Laser-induced fluorescence</i>

LTQ	MS+ESI+Quadrupole orbitrap
MILI	<i>Mycotoxin-Induced Liver Injury</i>
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
MS	<i>Mass spectroscopy</i>
MS Q-TOF	<i>Mass spectrometer quadrupole time-of-flight</i>
NCs	Nanocompostos
NF-κB	Fator Nuclear NF-kappaB
nMol	nanoMol
NPs	Nanopartículas
Nrf2	<i>Nf-E2-related transcription factor 2</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
Q	<i>Quadrupole orbitrap detector</i>
QD	<i>Quantum Dots</i>
QqQ	<i>Quadrupole tandem Quadrupole</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SELEX	Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TOF	<i>Time-Of-Flight</i>
UHPLC	<i>Ultra-high performance liquid chromatography</i>
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Lâmpada ultravioleta
μMol	microMol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivo específico.....	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	Biossíntese das aflatoxinas	17
3.2	Estudos de ocorrência	20
3.3	Metodologias analíticas e moleculares para detecção de aflatoxinas	21
3.4	Toxicidade das aflatoxinas	25
3.5	Legislação	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários carcinogênicos produzidos por fungos ascomicetos do gênero *Aspergillus* responsáveis por contaminação de *commodities* e alimentos causando toxicidade grave em humanos e animais (MARTÍNEZ *et al.*, 2023; XIE *et al.*, 2022; YASEEN; HANANO, 2022). Além de ameaçar a segurança alimentar e a saúde pública, também são responsáveis por perdas econômicas com a desvalorização do produto podendo até ser impeditivo de sua comercialização. A detecção precoce é uma estratégia preventiva eficaz (XIE *et al.*, 2022). Na natureza foram descobertas 26 tipos de AFs: B₁ (AFB₁), G₁ (AFG₁), B₂ (AFB₂), G₂ (AFG₂), B_{2a} (AFB_{2a}), G_{2a} (AFG_{2a}), D₁ (AFD₁), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), M_{2a} (AFM_{2a}), H₁ (AFH₁), P₁ (AFP₁), P₂ (AFP₂), P_{2a} (AFP_{2a}), M₁-P₁ (AFM₁-P₁), Q₁ (AFQ₁), Q₂ (AFQ₂), Q_{2a} (AFQ_{2a}), GM₁ (AFGM₁), GM₂ (AFGM₂), GM_{2a} (AFGM_{2a}), parasiticol (AFB₃), aflatoxicol I (AFL_I), aflatoxicol II (AFL_{II}), aflatoxicol M₁ (AFLM₁), e aflatoxina B₁ exo-8,9-epoxide (AFBO), sendo a AFB₁ considerada a mais tóxica e carcinogênica. A Figura 1 mostra a estrutura química das principais AFs, fórmula molecular, radicais presentes e os fungos produtores (LIAO *et al.*, 2020).

Apesar de terem sido descobertas na década de 60, até o momento continuam sendo objeto de pesquisa com a finalidade de reduzir os danos à saúde e prejuízos financeiros.

Com a finalidade de contextualização o tipo lógico de pesquisa será descritivo, com a problemática da contaminação de cereais e grãos que fazem parte da base alimentar humana e animal. A variável teórica (conceitual) é a segurança alimentar, e a variável operacional consistem na detecção de AFs por metodologias com uso de aptâmeros.

Figura 1 - - Estrutura química das aflatoxinas e fungos produtores

Types	Chemical Structures				Molecular Formulas	Producers of aflatoxins	
	Structures	R1	R2	R3		R4	<i>Aspergillus</i> fungi / Plants / Animals / Humans
AFB ₁	a	H	OCH ₃	=O	H	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	<i>A.flavus</i> ; <i>A.arachidicola</i> ; <i>A.bombycis</i> ; <i>A.minisclerotigenes</i> ; <i>A.nomius</i> ; <i>A.ochraceoroseus</i> ; <i>A.parasiticus</i> ; <i>A.pseudotamarill</i> ; <i>A.rambellii</i> ; <i>A.pseudocaelatus</i> ; <i>A.pseudonomius</i> ; <i>A.texensis</i>
AFB ₂	ac	H	OCH ₃	=O	H	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	<i>A.flavus</i> ; <i>A.arachidicola</i> ; <i>A.minisclerotigenes</i> ; <i>A.nomius</i> ; <i>A.parasiticus</i> ; <i>A.pseudocaelatus</i> ; <i>A.texensis</i>
AFB _{2a}	ad	H	OCH ₃	=O	H	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	<i>A.flavus</i> ; <i>A.niger</i> ; Poultry ; Metabolite of AFB ₂ in animals
AFB ₃ *	f	-	-	-	-	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	<i>A.flavus</i>
AFD ₁	g	-	-	-	-	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	Corn ; Peanut ; Cottonseed
AFG ₁	b	H	-	-	-	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	<i>A.flavus</i> ; <i>A.arachidicola</i> ; <i>A.minisclerotigenes</i> ; <i>A.nomius</i> ; <i>A.parasiticus</i> ; <i>A.pseudocaelatus</i> ; <i>A.texensis</i> ; Human
AFG ₂	bc	H	-	-	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	<i>A.flavus</i> ; <i>A.arachidicola</i> ; <i>A.minisclerotigenes</i> ; <i>A.nomius</i> ; <i>A.parasiticus</i> ; <i>A.pseudocaelatus</i> ; <i>A.texensis</i>
AFG _{2a}	bd	H	-	-	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	<i>A.flavus</i> ; <i>A.parasiticus</i> ; Metabolite of AFG ₂ in human urine
AFGM ₁	b	OH	-	-	-	C ₁₇ H ₁₃ O ₈	<i>A.flavus</i> ; <i>A.parasiticus</i>
AFGM ₂	bc	OH	-	-	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	<i>A.flavus</i> ; <i>A.parasiticus</i>
AFGM _{2a}	bd	OH	-	-	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₉	<i>A.flavus</i>
AFH ₁ *	a	H	OCH ₃	OH	OH	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Monkey ; Metabolite of AFQ ₁ in animals
AFLI	-	-	-	-	-	-	Human
AFLI'	a	H	OCH ₃	OH	H	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	<i>A.flavus</i> ; Metabolite of AFB ₁ in animals
AFM ₁	a	OH	OCH ₃	=O	H	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	<i>A.flavus</i> ; <i>A.parasiticus</i> ; Metabolite of aflatoxin B ₁ in poultry and mammals and comes from mothers' milk
AFM ₂	ac	OH	OCH ₃	=O	H	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	<i>A.parasiticus</i> ; Metabolite of aflatoxin B ₂ in animals and comes from mothers' milk
AFM _{2a}	ac	OH	OCH ₃	H	H	C ₁₇ H ₁₅ O ₈	<i>A.flavus</i>
AFLM ₁	a	OH	OCH ₃	OH	H	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Poultry ; mammals
AFP ₁	a	H	OH	=O	H	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	Metabolite of AFB ₁ in animals
AFP ₂	ad	H	OH	=O	H	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Metabolite of AFB ₂ in animals
AFP _{2a}	ac	H	OH	H	H	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	Metabolite of AFP ₁
AFM ₁ -P ₁	a	OH	OH	=O	H	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	Poultry ; Mammals
AFQ ₁	a	H	OCH ₃	=O	OH	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	Metabolite of AFB ₁ in poultry and mammals
AFQ ₂	ac	H	OCH ₃	=O	OH	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Metabolite of AFB ₂ in animals
AFQ _{2a}	ac	H	OCH ₃	H	OH	C ₁₇ H ₁₅ O ₈	Metabolite of AFQ ₁
AFBO	ae	H	OCH ₃	=O	H	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	Metabolite of AFB ₁ in poultry and mammals

Note: *. B₃ = Parasiticol, AFH₁ = aflatoxin R₀H₁ = aflatoxicol H₁, and AFLI = aflatoxicol = aflatoxin R₀

Fonte: LIAO et al. (2020)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Relatar o estado da arte do uso de aptâmeros na detecção de aflatoxinas.

2.2 Objetivo específico

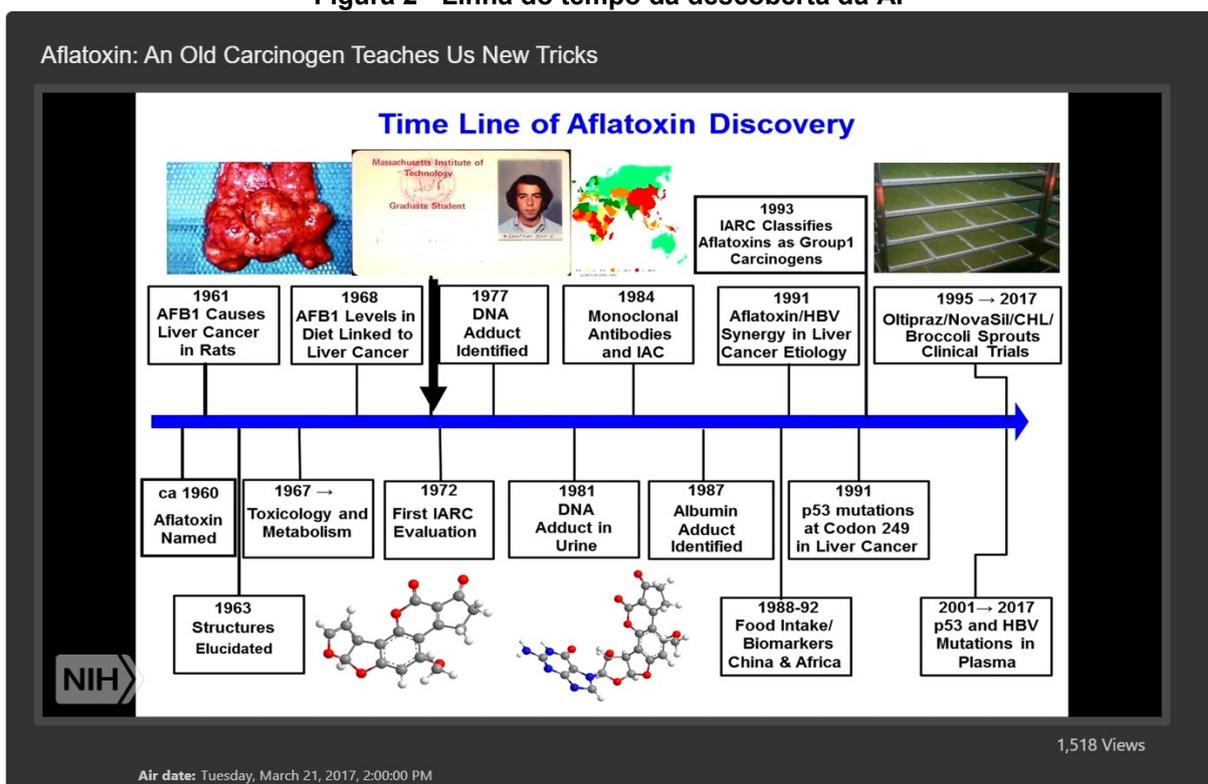
Revisar literatura disponível no Portal da Capes, na base de dados Web of Science™, PubMed Central (PMC) e MLA Bibliography (EBSCO) desde as primeiras publicações e o papel da bioinformática na obtenção dos aptâmeros.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A desvalorização de *commodities* devida contaminação com aflatoxinas e outras micotoxinas é de preocupação global, sendo que, acordo com Turner *et al.* (2015), para desenvolver uma metodologia, procura-se adotar o princípio *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), ou seja, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, pode-se adicionar também os conceitos de acessível e, de preferência, equipamento portátil que possa ser levado a campo (TURNER *et al.*, 2015). A biologia molecular alavanca fatores como a elucidação do mecanismo de toxicidade *in vivo*, as vias de biossíntese dos metabólitos secundários tóxicos pelos fungos, o mapeamento gênico (clusters, genes, proteínas, enzimas), interação com os fatores bióticos e abióticos, desenvolvimento de metodologias, etc. As ferramentas da biologia molecular atuam nas seguintes frentes: identificação taxonômica do fungo; ômicas (proteômica, genômica, metabolômica, transcriptômica, etc); melhoramento vegetal (desenvolvimento de cultivares resistentes à infecção de fungos micotoxigênicos); pesquisa e desenvolvimento); diagnósticos; metodologias analíticas (desenvolvimento de aptâmeros para serem utilizados em metodologias analíticas de detecção e quantificação diversas); na detecção/determinação da presença de genes fúngicos considerados chaves na biossíntese de AFs; no design de *primers*, síntese de moléculas, peptídeos, entre outros. As propriedades químicas da aflatoxina B1 também podem ser exploradas usando química computacional, que tem sido empregada, complementarmente, às investigações experimentais. Exemplos de estudo *in silico*, semiempíricos, Hastree-Fock, DFT, ancoragem molecular e dinâmica molecular (MARTÍNEZ *et al.*, 2023).

A Figura 2 mostra a linha do tempo da descoberta das AFs, desde a ocorrência da doença Turkey X (1960) que dizimou milhares de perus na Inglaterra devido ração à base de amendoim contaminado com *Aspergillus flavus*, sob a ótica da pesquisa em prol da saúde humana, em destaque na década de 90 a interação sinérgica com vírus da hepatite humana B (HBV) na etiologia do câncer hepático, a mutação genética do p53, os achados decorrente das ferramentas da biologia molecular, a busca de compostos capazes de inibirem os efeitos deletérios das AFs (“Aflatoxin”, 2017; PICKOVA *et al.*, 2021).

Figura 2 - Linha do tempo da descoberta da AF



Fonte: "Aflatoxin" (2017)

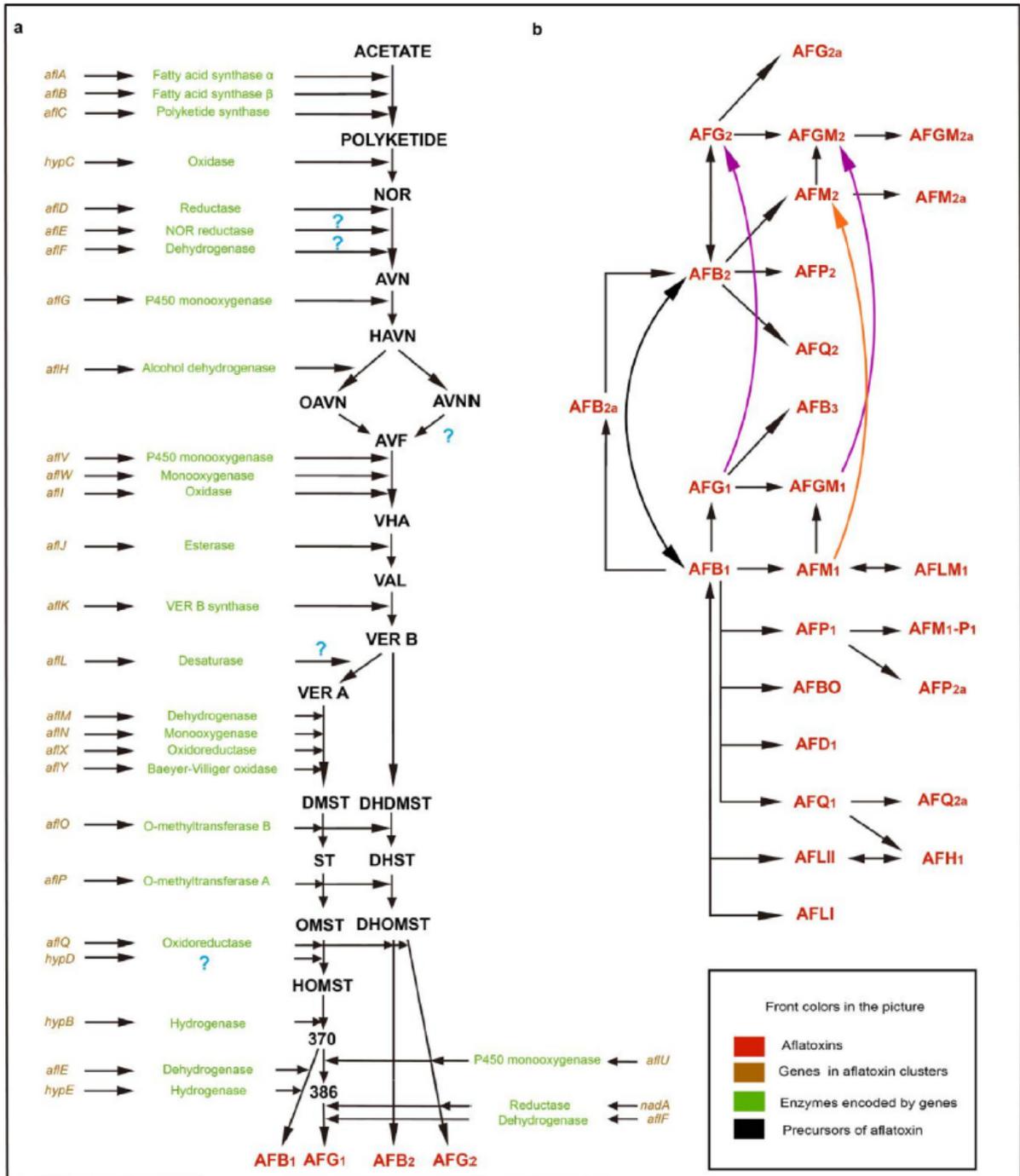
3.1 Biossíntese das aflatoxinas

A via de biossíntese das aflatoxinas (AFs) ainda não está totalmente elucidada (Figura 3). O conhecimento dos *clusters* de genes da aflatoxina (AF) que têm sido confirmados em algumas cepas de *Aspergillus* atualmente ainda recebem anotações com indicações de quadros/fase de leitura aberta de genes (*Open Reading Frames* – ORFs) e genes putativos. Foi proposto que a biossíntese de AFs envolva no mínimo 23 reações enzimáticas e é regulada por no mínimo 53 genes, agrupados em uma região de 75 kb do genoma do fungo no cromossomo III a cerca de 80kb de distância do telômero, sendo 39 positivos, 12 negativos e 2 outros (*nmrA* e *afmrtA*), dentre os 39 positivos *aflR* e *aflS* codificam reguladores específicos da via (LIAO *et al.*, 2020). Detalhes dos grupamentos (*clusters*) gênicos e a regulação genética da biossíntese de AFs estão na Figura 4.

O *A. flavus* NRRL 3357 é um microrganismo utilizado como modelo para o desenvolvimento de ferramentas moleculares e para estudos da regulação e produção de metabólitos secundários, que também produz níveis elevados de

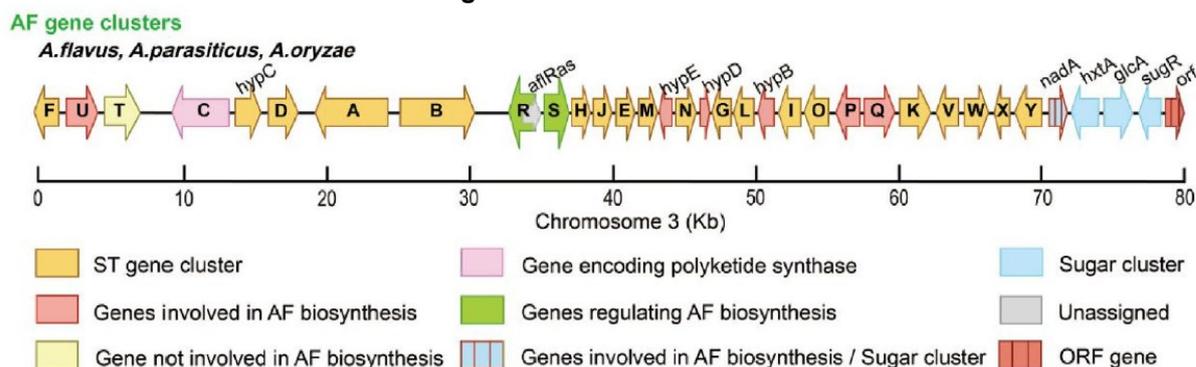
aflatoxinas, tem 8 cromossomos e um total de 13715 genes codificadores de proteínas previstos (SKERKER *et al.*, 2021).

Figura 3 - Via biossintética das AFs elucidada até o momento



Fonte: Liao *et al.*, (2020)

Figura 4 - Clusters das AFs



Fonte: Liao *et al.*, (2020).

O gene *aflR* codifica um motivo dedo de zinco binuclear (proteína AfIR DNA-ligante) responsável por ativar a transcrição dos demais genes, desta forma a expressão dos genes da via das AFs é bloqueada pela deleção de *aflR* em *A. flavus*. (CARY *et al.*, 2000) Chang *et al.*, 2007, estudou a falta de capacidade de produção de AFs pelo *A. sojae* e concluiu que está relacionada a uma mutação pontual no gene regulador *aflR*, que causa o truncamento no domínio da ativação transcricional da proteína AfIR e a abolição da interação entre AfIR e o co-ativador AfIJ que são necessários para a expressão gênica. Além disso, um defeito no gene da policetídeo sintase também contribui para sua não aflatoxigenicidade. Thakare *et al.*, [s.d.], demonstrou que com o silenciamento do gene *aflC* não houve detecção de AF em milho transgênico (CARY *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2007; THAKARE *et al.*, [s.d.]).

Outros genes que não pertencem ao *cluster* das AFs têm demonstrado ligação com a produção de AFs devido a biossíntese de AFs poder ser modulada por genes externos ao cluster e que são ativados ou reprimidos por estímulos ambientais como fonte de nutrientes, mudanças ambientais assim como resposta oxidativa, pois as vias envolvidas são complexas, múltiplas e interconectadas (CACERES *et al.*, 2020). Xie *et al.* (2022) presume que a presença ou maior quantidade de alguns metabólitos estão relacionadas com a maior virulência da cepa, indicando capacidade de produção de aflatoxinas (cepas aflatoxigênicas) (XIE *et al.*, 2022).

Constata-se que toda pesquisa que apresente peculiaridades (anotações) a nível molecular que auxiliem na elucidação da função dos genes juntamente com a atuação dos fatores externos (temperatura, umidade, atividade de água) é um importante aliado para a segurança alimentar e redução das perdas econômicas.

3.2 Estudos de ocorrência

Estudos de ocorrência e prevalência são abundantes, e auxiliam no embasamento da importância da detecção precoce e mostra a exposição a que a população está submetida, esta exposição por sua vez, também pode ser ocupacional pela inalação ou contato dérmico de poeira contaminada. Camiletti et al., 2017, constatou que a contaminação por aflatoxinas em grãos de milho cultivados na Argentina tem aumentado desde 2008 e que *Aspergillus* seção Flavi foram detectados em 73% das amostras (CAMILETTI et al., 2017). A seção Flavi abrange ambas espécies prejudiciais e benéficas de *Aspergillus*, tais como *A. oryzae* utilizado em fermentações de alimentos e produção de enzimas e *A. flavus*, produtor de micotoxinas e espoliador de alimentos (KJÆRBØLLING et al., 2020). Estes fungos também foram identificados em mandioca e seus produtos e a maioria das cepas (73,3%) testaram a habilidade de produzir aflatoxinas em meio sintético apesar dos produtos estarem livres de aflatoxina (ONO et al., 2021). As taxas de contaminação de amendoim pré e pós-colheita com *A. flavus* foi 30,0% e 39,2% de acordo com o trabalho de Acur et al., (2020) (ACUR et al., 2020). Entre diferentes amostras de grãos testados, 83% do amendoim, 69% do milho, 57% do sorgo e 29 % do arroz tinham níveis de aflatoxina B1, acima do permitido (PRIYANKA et al., 2014). Oitenta por cento (80%) do chili (pimentas) obtidos de mercados tradicionais e modernos da Indonésia estavam infectados por *Aspergillus* spp. nos quais 50% das infecções foram identificadas como *A. parasiticus* e *A. flavus*. Sendo que a infecção fúngica ocorre no campo e durante o armazenamento, sugerindo a implementação de boas práticas de cultivo e manuseio (WIKANDARI et al., 2020). Algammal et al., (2021) verificou a prevalência de *A. flavus* em produtos cárneos: 15% em bastermá, 7,5% em linguiça e 10% em carne moída sendo que a aflatoxina B1 foi detectada em 15% das amostras de bastermá (06 amostras) (ALGAMMAL et al., 2021).

As AFs podem contaminar commodities, amendoim, milho, arroz, algodão, legumes, cereais, trigo, cevada, aveia, nozes e castanhas, pimentas, óleos vegetais, cacau, frutas secas/desidratadas, figos, café, alimentos processados, papinhas de bebê, carnes, leite, leite materno (MARIN et al., 2013; MARTÍN-CARRASCO et al., 2023). Antes de 1985 a *Food and Agriculture Organization* (FAO) estimou 25% das culturas de alimentos contaminadas por micotoxinas, entretanto a origem desta

declaração é desconhecida. Em 2020 a ocorrência atual de micotoxinas foi estimada com base na literatura publicada e parece confirmar a estimativa da FAO de 25%, embora este número subestime bastante a ocorrência acima dos níveis detectáveis (até 60-80%). O aumento da ocorrência é provavelmente explicado pela combinação do melhoramento da sensibilidade dos métodos analíticos e o impacto das mudanças climáticas (ESKOLA *et al.*, 2020).

3.3 Metodologias analíticas e moleculares para detecção de aflatoxinas

Uma análise de AFs possui vários pontos críticos que se não forem observados podem acarretar um erro final resultando em falsos negativos. As metodologias exigem rigor em seus procedimentos, que incluem correta amostragem (amostra representativa), processos de extração, purificação ou concentração que se tornam uma etapa limitante devido seu custo (fase pré-analítica), a análise propriamente dita e emissão do resultado. São exemplos de métodos pré-analíticos ou métodos preparativos: extração líquido-líquido (LLE - *liquid-liquid extraction*), extração em fase sólida (SPE - *solid phase extraction*), imunoafinidade (IA - *immunoaffinity*), microextração em fase sólida (SPME - *solid phase microextraction*). Nas técnicas mais recentes a etapa de extração não é necessária. Para o processo analítico devem-se considerar os itens: existência de vários alvos de interesse (contaminação múltipla); química variada; múltiplas matrizes (diferentes tipos de amostras); amostragem; limitações geográficas e financeiras (quanto ao acesso a tecnologias); finalidade do teste (para uso no campo ou pós-colheita em laboratório), velocidade do teste (que influencia na quantidade de testes/amostras que podem ser realizados/processados); limites de detecção ou quantificação na ordem de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (partes por bilhão – ppb) o que exige que o método tenha sensibilidade e especificidade; natureza das medições necessárias, entre outros (TURNER *et al.*, 2015).

Em relação aos métodos cromatográficos, eles serão apenas citados (Quadro 1), não entrando nos méritos ou procedimentos, sendo estes: TLC (*Thin Layer Chromatography*) cromatografia em camada delgada; GC (*Gas Chromatography*) cromatografia em fase gasosa; LC (*Liquid chromatography*) cromatografia líquida; HPLC (*High-performance liquid chromatography*) cromatografia líquida de alta eficiência; HPLC capilar; micro HPLC; UHPLC (*Ultra-*

High Performance Liquid Chromatography) cromatografia líquida de ultra alta eficiência. A aquisição/detecção do sinal pode ser: Colorimétrico; FD (*Fluorescence detector*) detector de fluorescência; CCD (*Charge-coupled device*) dispositivo de carga acoplada; UV lâmpada ultravioleta; Fotossensores/fotodetectores; MS (*Mass Spectroscopy*) espectrometria de massa; MS/MS espectrômetros de massa “*tandem*”, em sequência; DAD (*Diode Array Detector*) detector de arranjo de diodos; LIF (*Laser-induced fluorescence*) fluorescência induzida por laser; TOF (*Time-Of-Flight*) detector de tempo de voo; ESI (*Electrospray Ion Source*) fonte de eletropulverização de íons; Q (*Quadrupole Orbitrap detector*); HPLC-MS cromatografia líquida com espectrometria de massa; LTQ-Orbitrap (MS+ESI+Orbitrap); MS Q-TOF (*Mass Spectrometer quadrupole time-of-flight*); QqQ (*Quadrupole tandem Quadrupole*) (TURNER *et al.*, 2015).

Quadro 1 - Métodos cromatográficos e detectores utilizados para aflatoxinas

Toxina	Matriz	Método	Detector
AFs	Milho, amendoim	TLC	UV
AFs	Pistache	HPLC	DAD
AFs	Produto dietético complexo	HPLC	FD
AFs	Leite, ovos, carne	HPLC	UV e FD
AFs	Rações para animais	HPLC com coluna multifuncional	FD
AF M1	Leite humano	HPLC	FD
AF M1	Produtos lácteos	HPLC	FD
AF M1	Leite	HPLC	MS/MS
AFs	Rações para animais	UHPLC	MS/MS
AFs	Azeitonas e drupas	Triagem por LIF (Laser Induced Fluorescence) HPLC	MS

Fonte: Adaptado de Turner *et al.*, (2015)

São testes sorológicos baseados na reação antígeno-anticorpo: ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), ELIME (*Enzyme linked immunomagnetic electrochemical-array*), FLISA (*Fluorescence-Linked immuno Sorbent Assay*), CELISA (*cellular/complement-enzyme linked immuno sorbent assay*); as nanopartículas (NPs), nanocompostos (NCs), pontos de carbono (*Quantum dots - QD*), polímeros impressos molecularmente (*Molecularly Imprinted Polymers - MIP*) e aptâmeros são os principais componentes dos biosensores mais recentes e são mostrados no Quadro 2.

Quadro 2 - Métodos baseados em anticorpos e aptâmeros

(continua)

Toxina	Matriz	Método	Categoria	Detector
AFs	Milho	ELISA	Imunológico	Célula Fotoelétrica ou fotocélula
AFs	Milho	ELIME	Imunológico	Transdutor eletroquímico
AFs	Cereais	FLISA (ponto quântico vinculado)	Imunológico	FD
AFB ₁	Amendoim	cFLISA	Imunológico	FD
AFB ₁ e M ₁	Vários alimentos, leite	ELISA competitivo indireto	Imunológico	Absorvância UV
AFM ₁	Leite e produtos lácteos	ELISA competitivo ("sandwich")	Imunológico	Absorvância UV ou quimiluminescência
AFs	Pimentas	ELISA competitivo	Imunológico	Absorvância UV
AFB ₁	Vinho e cerveja	ELISA competitivo indireto aprimorado	Imunológico	Optico
AFs totais	Amendoim	Tira imunocromatográfica (ICS)	Biossensores	Colorimétrico
AFs totais	Amostras modelos	Ligação direta	Biossensores	Microcantilever
AFB ₁	Azeite, milho, alimentos variados, amendoim, trigo, arroz	Ligação direta	Biossensores	Espectroscopia de impedância eletroquímica ou Eletroquímicos ou Piezoelétrico ou FD (extinção intrínseca)
AFM ₁	Leite	Ligação direta	Biossensores	Fluorescência aprimorada por plasma de superfície
AFB ₁	Amostras modelos	Ligação direta ao nanotubo de carbono modificado por anticorpo	Biossensores	Eletroquímico
AFB ₁	Milho	Ligação direta ao chip imunocromatografico	Biossensores	FD
AFB ₁	Amostras modelos	Nanopartículas revestidas com anticorpos e esferas magnéticas	Biossensores	Espectroscopia Raman de superfície aprimorada
AFB ₁	Vários	Imunoensaio ligado a sonda de fago	Biossensores	Colorimétrico
AFB ₁	Trigo, vários	Imunoensaio competitivo indireto	Biossensores	Colorimétrico ou Piezoelétrico
AFB ₁	Vários	Ensaio de tira imunológica de fluxo lateral	Biossensores	Colorimétrico

Quadro 3 - Métodos baseados em anticorpos e aptâmeros

(conclusão)

Toxina	Matriz	Método	Categoria	Detector
AFB ₂	Nozes, castanhas	Ensaio de tira/fita imunológica de fluxo lateral	Biossensores	Colorimétrico
AFB ₁	Amostras modelo	Ensaio de fluxo lateral	Biossensores	Colorimétrico
AFB ₁	Arroz	ELISA competitivo indireto	Biossensores	Eletroquímico
AFM ₁	Leite em pó	ELISA competitivo indireto	Biossensores	Eletroquímico
AFB ₁	Amostras modelo	Nanopartículas de RnNi revestidas por anticorpos imobilizadas em superfície de óxido de índium-estanho	Biossensores	Eletroquímico
AFB ₁	Amostras modelo	Nanopartículas magnéticas modificadas por antígeno	Biossensores	Sondas de sinal de NPs de conversão ascendente funcionalizadas com anticorpos
AFM ₁	Leite	Imunoensaio de fluxo lateral de duas etapas	Biossensores	Colorimétrico
AFM ₁	Leite	Ensaio impedimétrico	Biossensores	Eletroquímico
AFM ₁	Leite	ELISA competitivo direto	Biossensores	Eletroquímico
AFB ₁	Amendoim, milho	Captura aptamérica ligada a dendrímero	Biossensores	Eletroquímico
AFB ₁	Feno, arroz	Interação DNA competitiva	Biossensores	PCR
AFB ₁	Milho	Ligação direta	Biossensores	SPR
AFB ₁	Milho	Interação DNA competitiva	Biossensores	Fluorescência
AFB ₁	Milho	Ensaio competitivo	Biossensores	Quimioluminescência
AFM ₁	Leite	Ligação direta	Biossensores	SPR

Fonte: Adaptado de Turner *et al.*, (2015)

Niessen (2008) cita que Geisen e Shapira *et al.* ambos no ano de 1996, publicaram os primeiros sistemas baseados em técnicas de reação em cadeia da polimerase (em inglês *polymerase chain reaction* – PCR) desenvolvido para fungos aflatoxigênicos, ambos fizeram uso de três pares de *primers* em uma PCR multiplex para os genes *afID* (denominação anterior *nor-1*), *afIM* (*ver-1*) e *afIP* (*omtA*). Geisen (1996) verificou que o gene *afID* seria o responsável pela produção de AFs, e Shapira *et al.* que cepas não aflatoxigênicas não deram origem a produtos de amplificação com um ou todos os pares de primers testados, ressaltando que a

amplificação de marcadores genômicos específicos é uma técnica mais rápida que o cultivo e crescimento do fungo em estudo; e que Bu *et al.* em 2005 utilizou *primers* baseados nas sequências da região interna transcrita (do inglês *internal transcribed spacer* - ITS) ITS1 e 5.8 S do gene rRNA de *A. flavus* como marcador molecular para identificação filogenética (NIESSEN, 2008).

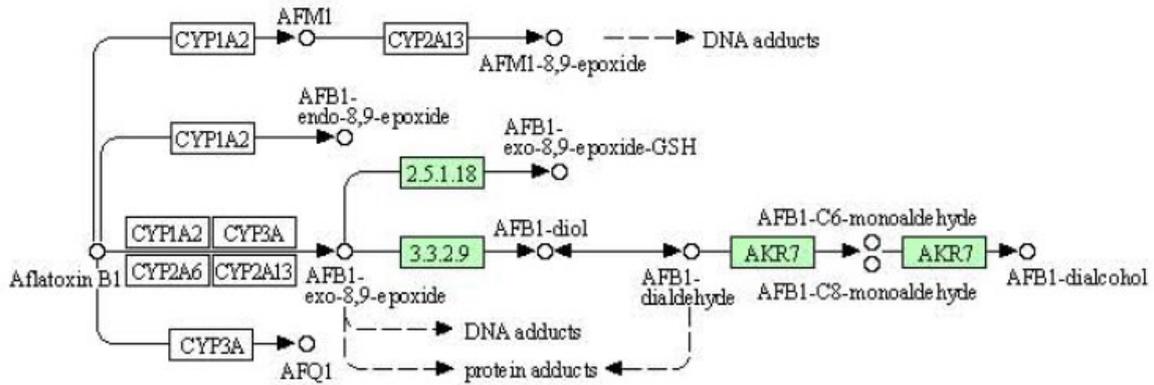
3.4 Toxicidade das aflatoxinas

Estudos têm revelado a existência de no mínimo 400 micotoxinas diferentes, sendo as aflatoxinas, em especial a AFB1, a mais tóxica pela classificação da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e a mais estudada até o momento, principalmente em estudos *in vivo* com a finalidade de entender o mecanismo de ação que leva à perda da homeostase (equilíbrio). No período de 2009 a 2019, 22% dos artigos com experimentos *in vivo* em organismos vertebrados foram realizados com a AFB1 e o objetivo mais comum foi a imunotoxicidade (30%), enquanto o restante consiste em estudos de genotoxicidade, estresse oxidativo, hepatotoxicidade, citotoxicidade, teratogenicidade e neurotoxicidade. Apesar das tentativas de reduzir seu conteúdo nos alimentos, ainda não obteve sucesso na resolução do problema principal relacionado à sua toxicidade (BENKERROUM, 2020; CIMBALO *et al.*, 2020). Na última década, os olhares estão voltados para a ação imunológica e aspectos transcriptômicos das micotoxinas, confirmando sua toxicidade a nível molecular.

O processo de degradação dos compostos aromáticos (Figura 5) é responsável pela genotoxicidade e carcinogenicidade mediada pelo AFB₁-exo-8,9 epóxido (AFBO), molécula altamente instável formada pela ação de enzimas microsossomais citocromicas (CYP450) que catalisam a oxidação da dupla ligação do C8=C9 do anel furano da A; a AFBO pode se ligar em resíduos de guanina do material genético formando adutos de DNA, a aflatoxina-N7-guanina (AFB-N7-Gua) (MA *et al.*, 2022). O aduto epóxido catalisa uma mutação G → T no gene de supressão tumoral p53, causando uma mutação *missense* inativando o produto gênico e levando a danos (BENKERROUM, 2020; MARTINS *et al.*, 2021). A toxicidade pode ser crônica, quando decorrente de exposição a baixas concentrações por longo período de tempo ou aguda se ocorre num curto período de

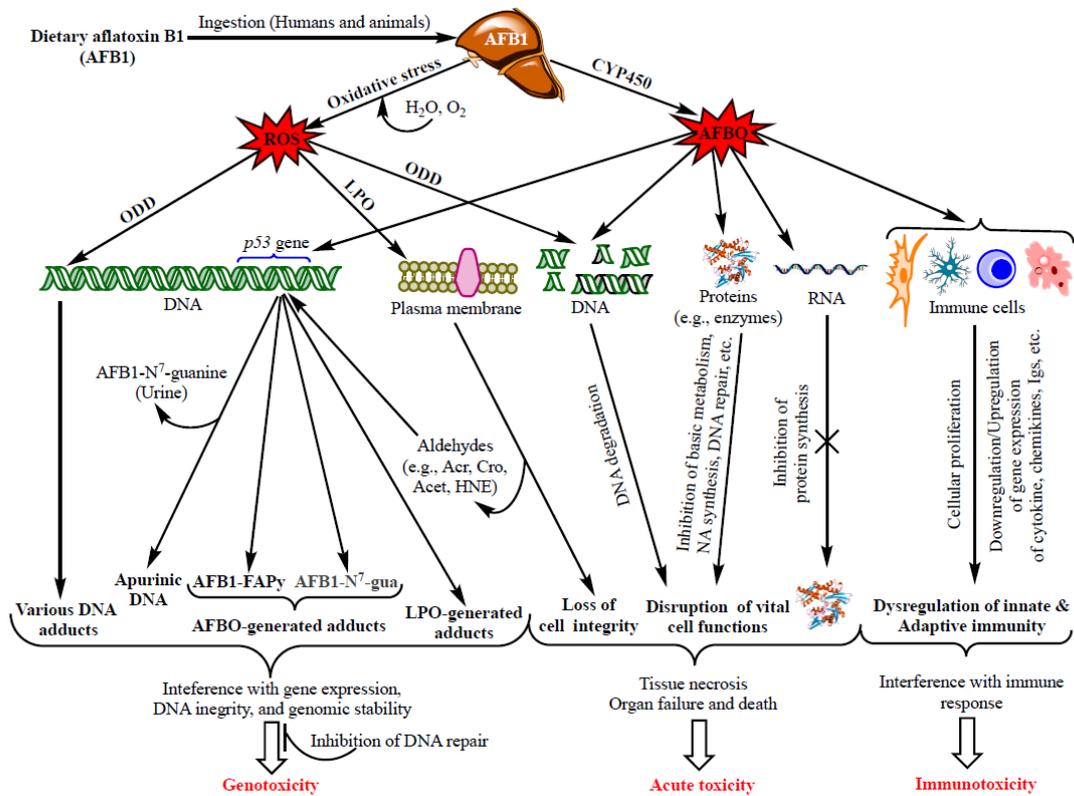
tempo com elevada exposição, ou seja, quando a formação de adutos de aflatoxinas supera a capacidade das enzimas detoxificantes de fase II e os mecanismos antioxidantes de defesa celular; em ambos os casos, deve se atentar, pois os efeitos adversos são cumulativos. A Figura 6 ilustra o mecanismo de genotoxicidade, imunotoxicidade e toxicidade aguda (BENKERROUM, 2020).

Figura 5 - Processo de degradação biológica da aflatoxina



Fonte: MA et al.,(2022)

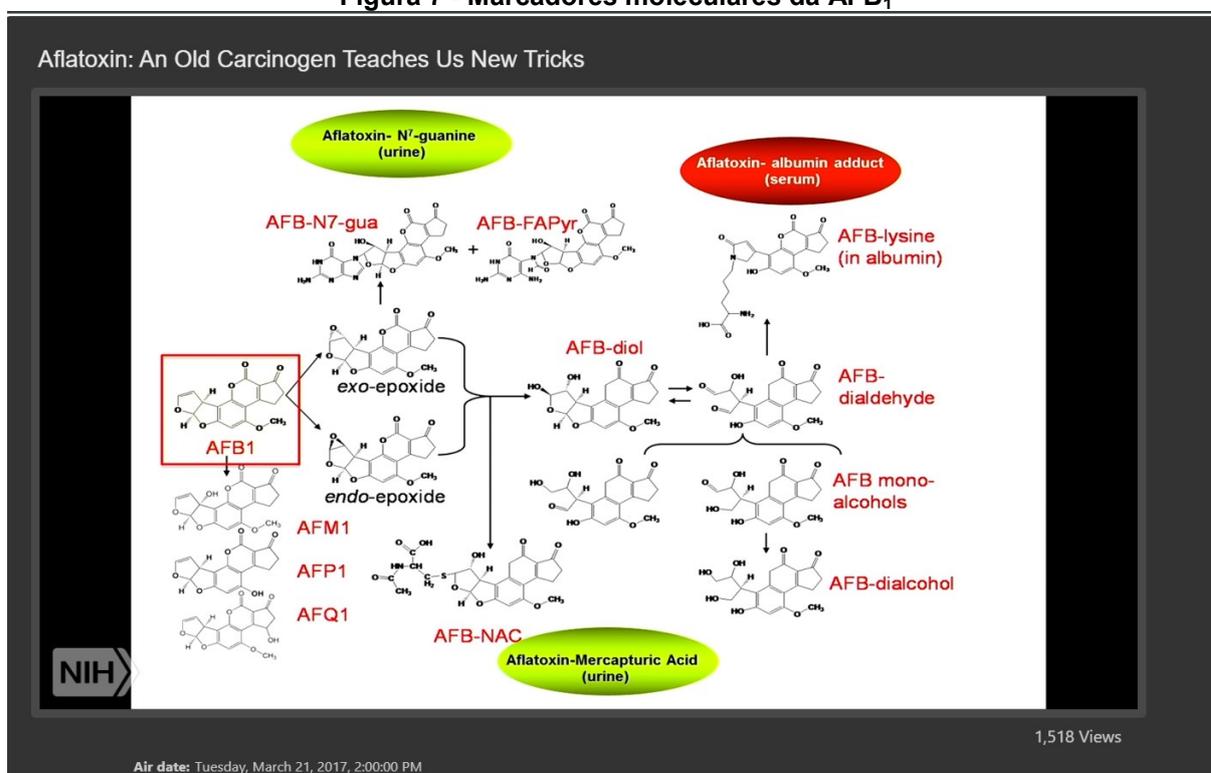
Figura 6 - Mecanismo de genotoxicidade, toxicidade aguda e imunotoxicidade



Fonte: Benkerroum (2020)

Os marcadores moleculares são mostrados na Figura 7, em que a aflatoxina-N7-guanina (AFB-N7-Gua) e a aflatoxina-ácido mercaptúrico são encontrados na urina, e os adutos de aflatoxina-albumina são encontrados na fração do sangue chamado de soro. Um dos metabólitos da AFB₁ é a AFM₁, por isso ressalta-se que a ingestão de alimentos contaminados por mães que amamentam ou ração contaminada por matrizes leiteiras é uma fonte de exposição em potencial.

Figura 7 - Marcadores moleculares da AFB₁



Fonte: "Aflatoxin" (2017)

O mecanismo da lesão hepática induzida por micotoxina (*Mycotoxin-Induced Liver Injury – MILI*) é caracterizada segundo seu agente causador. Sugere-se que, a AFB₁ induz danos hepáticos ativando o receptor aril-hidrocarbonetos (*Aryl Hydrocarbon Receptor - AHR*), receptor constitutivo androstane (*Constitutive Androstane Receptor – CAR*) e receptor pregnane X (*Pregnane X Receptor – PXR*). O principal mecanismo de hepatotoxicidade é a ativação da via Wnt/TGF-β/β-

catenina à montante para produzir dano (ativação do CAR), estresse oxidativo por reduzir significativamente a expressão de Nrf2 (*Nf-E2-related transcription factor 2*), inflamação por ativação da via inflamatória clássica NF-κB (fator nuclear NF-kappaB) e regular positivamente citocinas inflamatórias como Interleucina-1β (IL-1β), Interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral α (TNF-α) e Ciclooxigenase-2 (COX-2), inibe autofagia que tem função conservadora e atua a nível de organela, estrutura (beclin-1, ATG5, Dynein, LC3a, LC3b-I/II), modulação negativa de p53 e mTOR, e indução de apoptose de hepatócitos (FS, TNFJR1, XIAP e Bcl-2, Caspase-3). A AFB1 regula negativamente a expressão gênica de citocromo P450 (isoformas CYP450), CYP1A2, CYP2A19, CYP2E1 e CYP3A29 em fígado de leitão e aumentou a expressão de fatores relacionados a espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) e fatores pró-apoptóticos p53 em fígado de camundongos, resultando em danos aos DNA do hepatócito, entretanto o dano aos hepatócitos pode ocorrer sem a toxicidade das ROS. As micotoxinas ainda induzem a desordem da flora intestinal, reduzem a função imune, prejudicam a barreira intestinal, reduzem os tipos de nutrientes no intestino e destroem muitas vias metabólicas dependentes da flora intestinal (RUAN *et al.*, 2022).

3.5 Legislação

A relevância das AFs também se expressa nas legislações de vários países. Neste trabalho comparou-se a do Brasil, da União Européia e dos Estados Unidos da América (USA). Referente aos alimentos de consumo humano (Quadro 3), temos a Instrução Normativa 160/2022 vigente no Brasil (BRASIL, 2022), o Regulamento da Comissão 2023/915 da União Européia (UNIÃO EUROPEIA, 2023) e o *FDA Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed* (USA, 2020).

Quadro 4 - Limites máximos permitidos em alimentos

Alimentos	Tipo de Aflatoxina	IN ANVISA 160/2022 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ^a	Regulamento da Comissão (EU) 2023/915 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	FDA Guidance for Industry (USA) (ppb)
Leite em pó	AFM ₁	5	0,025	-
	AFB ₁	-	0,1	-
Leite	AFM ₁	0,5	0,05	0,5 Referência CPG 527.400
Queijos	AFM ₁	2,5		
Castanha do Brasil	AFT:	20	10	20 Referência CPG 570.200
	AFB ₁ :	-	5	-
Amendoim e derivados	AFT	20	4	20 Referência CPG 570.375
	AFB ₁	-	2	-
Pistache, nozes, avelãs, amêndoas	AFT	10	10	20 Referência CPG 570.500
	AFB ₁	-	8	-
Amêndoa de cacau	AFT	10		
Frutas desidratadas e secas	AFT	10	4	-
	AFB ₁	-	2	-
Alimentos	AFT			20 Referência CPG 555.400
Alimentos infantis, fórmulas	AFT	1	-	-
	AFB ₁	-	0,1	-
Alimentos a base de cereais	AFT	5	4	-
	AFB ₁	-	2	-
Especiarias (pimentas, noz-moscada, gengibre, cúrcuma)	AFT	20	10	-
	AFB ₁	-	5	-
Feijões e sementes secas de leguminosas	AFT	5		
Produtos de cacau e chocolate	AFT	5		
Milho e seus derivados	AFT	20	10	20 Referência CPG 555.400
	AFB ₁	-	5	-

Legenda: ^a $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ equivale a ppb;

Fonte: Adaptado de BRASIL (2022), UNIÃO EUROPEIA (2023) e USA (2020)

A Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 do Ministério da Agricultura, publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988) regulamentava o limite máximo permitido de AFs para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal, entretanto ela foi revogada pela Instrução Normativa N° 30, de 05 de agosto de 2009 que apenas prevê procedimentos para o registro e rotulagem de produtos destinados a animais de companhia e não faz menção de contaminantes (BRASIL, 2009). Essa situação tem sido contornada utilizando o preconizado pela portaria revogada (LAMIC, [s.d.]). O Quadro 4 mostra a comparação da Portaria No 07/1988, da Diretiva 2002/32/EC do Parlamento e do Conselho (EU) (UNIÃO EUROPÉIA, 2002), e a *Compliance Policy Guide* CPG 683.100 dos USA (FDA, 2019).

Quadro 5 - Limites máximos permitidos em commodities para ração animal

Commodities para Rações animais	Tipo de Aflatoxina	Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)^a	Diretiva 2002/32/EC do Parlamento e do Conselho (EU) (mg.kg^{-1})^b	FDA Guidance for Industry (USA) (ppb)
Milho	AFT:	50	-	300 20* (Referência CPG 683.100)
	AFB ₁	-	0,02 0,005**	-
Amendoim	AFT:	50	-	300 20* (Referência CPG 683.100)
	AFB ₁	-	0,02 0,005**	-
Caroço de algodão	AFT:	50	-	300 20* (Referência CPG 683.100)
	AFB ₁	-	0,02 0,005**	-
Outras matérias-primas	AFT	50	0,05	-

Notas: ^a $\mu\text{g.kg}^{-1}$ equivale a ppb; ^b mg.kg^{-1} equivale a ppm; AFT= aflatoxinas totais (B1+B2+G1+G2); *de acordo com o FDA (USA) a concentração de aflatoxinas em *commodities* para produção de ração depende do uso pretendido, sendo menor para animais muito jovens, animais de estimação (pets) e gado leiteiro; **a concentração permitida em alimentos completos para gado bovino leiteiro é de 0,005 ppm e para animais jovens é de 0,01 ppm.

Fonte: Adaptado de BRASIL (1988), UNIÃO EUROPÉIA (2002) e FDA (2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O retorno de busca na base de dados Web of Science™ (WOS) apenas com o "Tópico=(aflatox*)" foi de 26.346 resultados (abrangendo o período de 1963 a 2024), em MLA Bibliography (EBSCO) e PubMed Central (PMC) selecionando "Todos os campos=(aflatox*)" teve 110.736 (em todo período) e 27.630 (de 1960 a 2024) resultados, respectivamente. Após refinamentos com o booleano "AND (molecular detection) AND (apta*)" obteve-se cento e doze (112), trezentos e oito (308) e um mil e quarenta e sete (1.047) resultados nas bases WOS, EBSCO e PMC, respectivamente.

Por se tratar de um problema de saúde pública e bem estar animal de abrangência global que acomete principalmente países em desenvolvimento, foi utilizado todo o período de tempo com registro nas bases de dados, entretanto o termo aptâmeros ou aptasensor apareceu a partir do ano de 2000 como mostrado pela revisão publicada por (VIDAL et al., 2013).

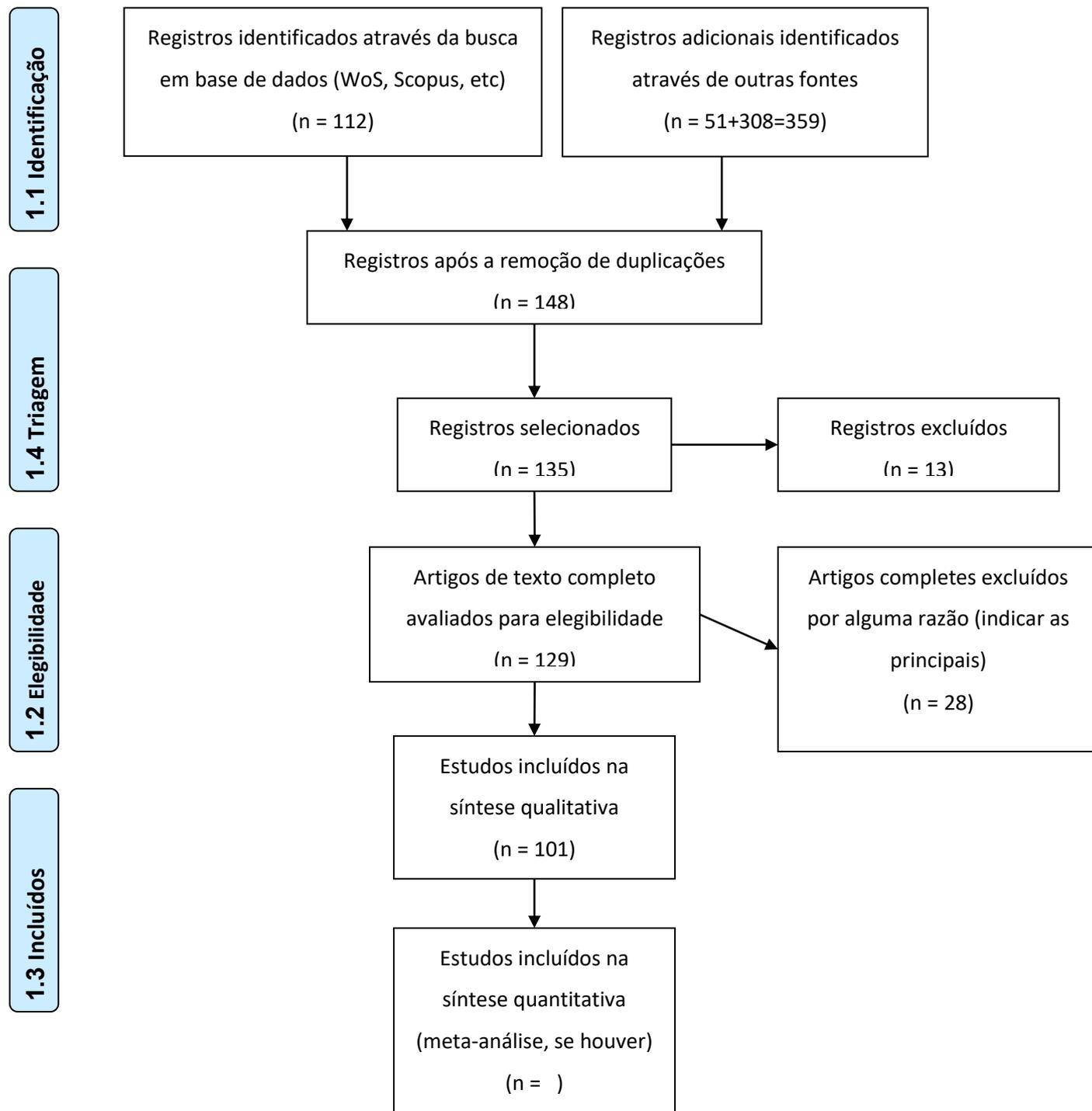
A última pesquisa foi realizada no ano de 2024 e lembrando que a quantidade de resultados obtidos varia com o passar do tempo devido à inclusão de novas publicações. Tabulando as três bases de dados, obteve-se 235 resultados, dos quais 87 eram repetidos, restando 148 artigos elegíveis para revisão manual, dos quais foram separados 129 (n=129) artigos completos revisados por pares publicados em periódicos indexados conforme pode se visualizar no Flow Chart do Prisma (Figura 8).

Os resultados obtidos nas bases de dados EBSCO e PMC serão considerados como outras fontes.

Figura 8 - PRISMA 2009 Flow Diagram



PRISMA 2009 Flow Diagram



Fonte: (MOHER et al., 2009)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos cento e um (101) registros após refinamentos; por meio da ferramenta “analisar resultados” do Web of Science™ (WOS) foram gerados os gráficos e figuras apresentados abaixo. O índice H é um instrumento para mensurar a produtividade dos autores. Quanto mais alto, maior a correlação entre artigos publicados e respectivas citações. O Fator H obtido por meio da ferramenta “relatório de citações” do WOS foi de 34 (WOS, 2024).

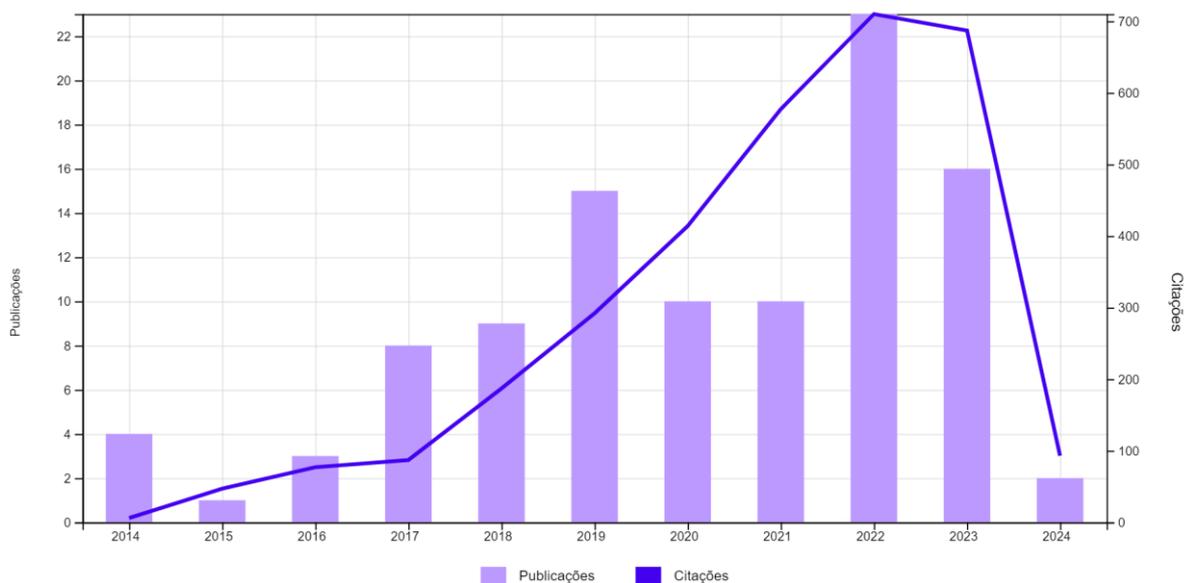
Quadro 6 - Top 10 artigos mais citados

Ranking	Título	Autores
1	FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of aflatoxin B1 in peanut and rice	Sabet, Fereshte Sadat; Hosseini, Morteza; Khabbaz, Hossein; Dadmehr, Mehdi; Ganjali, Mohammad Reza
2	An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1	Shim, Won-Bo; Kim, Min Jin; Mun, Hyoyoung; Kim, Min-Gon
3	Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B1	Guo, Xiaodong; Wen, Fang; Zheng, Nan; Luo, Qiujiang; Wang, Haiwei; Wang, Hui; Li, Songli; Wang, Jiaqi
4	Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform	Castillo, Gabriela; Spinella, Katia; Poturnayova, Alexandra; Snejdarkova, Maja; Mosiello, Lucia; Hianik, Tibor
5	Aflatoxin B1 Electrochemical Aptasensor Based on Tetrahedral DNA Nanostructures Functionalized Three Dimensionally Ordered Macroporous MoS ₂ -AuNPs Film	Peng, Gang; Li, Xiaoyan; Cui, Feng; Qiu, Qianying; Chen, Xiaojun; Huang, He
6	Bi-color FRET from two nano-donors to a single nano-acceptor: A universal aptasensing platform for simultaneous determination of dual targets	Qian, Jing; Cui, Haining; Lu, Xiaoting; Wang, Chengquan; An, Keqi; Hao, Nan; Wang, Kun
7	Portable Aptasensor of Aflatoxin B1 in Bread Based on a Personal Glucose Meter and DNA Walking Machine	Yang, Xincheng; Shi, Dongmin; Zhu, Shengmei; Wang, Baojuan; Zhang, Xiaojun; Wang, Guangfeng
8	A label-free fluorescent aptasensor for the detection of Aflatoxin B1 in food samples using AIEgens and graphene oxide	Jia, Yongmei; Wu, Feng; Liu, Peilian; Zhou, Guohua; Yu, Biao; Lou, Xiaoding; Xia, Fan
9	Design of a Dual Channel Self-Reference Photoelectrochemical Biosensor	Hao, Nan; Zhang, Ying; Zhong, Hui; Zhou, Zhou; Hua, Rong; Qian, Jing; Liu, Qian; Li, Henan; Wang, Kun
10	A large Raman scattering cross-section molecular embedded SERS aptasensor for ultrasensitive Aflatoxin B1 detection using CS-Fe ₃ O ₄ for signal enrichment	Chen, Quansheng; Yang, Mingxiu; Yang, Xiaojing; Li, Huanhuan; Guo, Zhiming; Rahma, M. H.

Fonte: (WOS, 2024)

As publicações tiveram uma queda em 2020 e 2021, anos mais severos da pandemia de SARS-CoV-2, entretanto as citações continuaram em ascensão. Em 2020 foram publicados cinco artigos de revisão e em 2021 e 2022 quatro em cada ano (Figura 11).

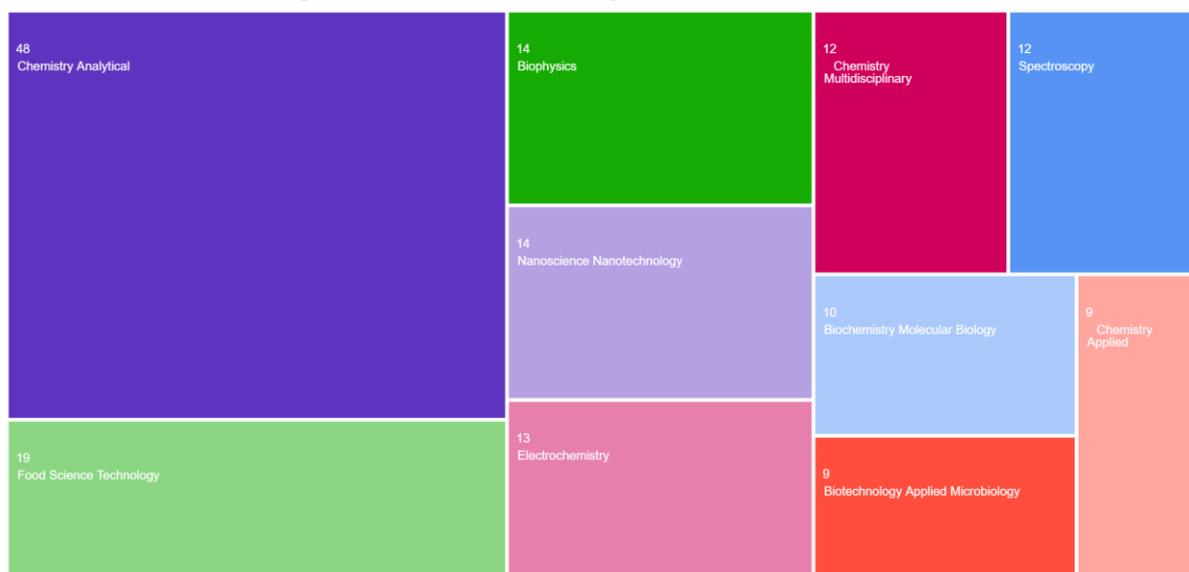
Figura 9 - Citações e publicações ao longo do tempo



Fonte: Wos (2024)

Ao tratar de metodologia, a área de destaque é a química analítica seguida pela tecnologia de alimentos (Figura 12).

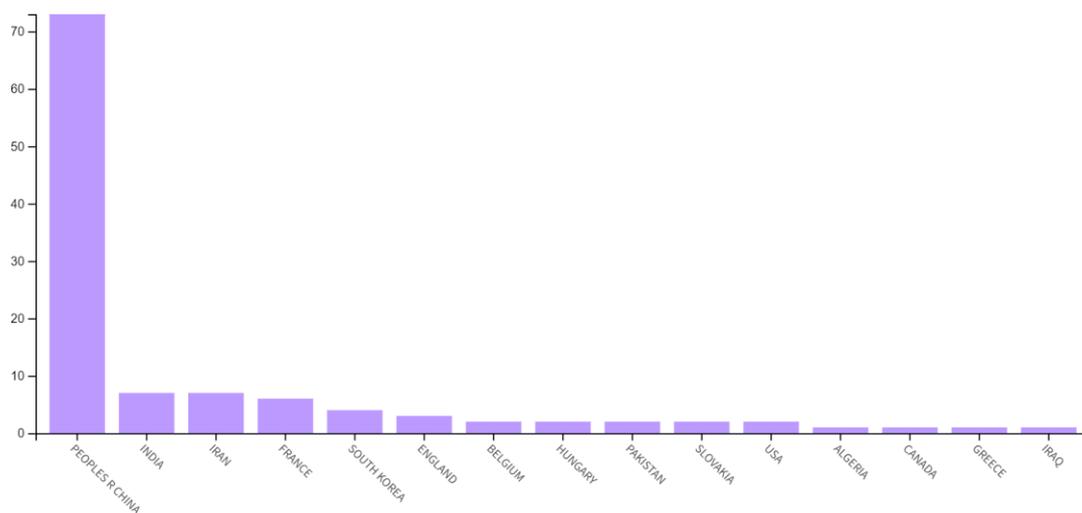
Figura 10 - Principais categorias de citações MESO



Fonte: Wos (2024)

O top 10 autores que mais publicaram pertencem a instituições chinesas. Observando-se as Figuras 13 e 14, percebe-se a correlação existente entre o país que mais publicou no tema com o top 10 autores.

Figura 11 - Países que mais publicaram no tema



Fonte: Wos (2024)

Figura 12 - Top 10 autores que mais publicaram no tema

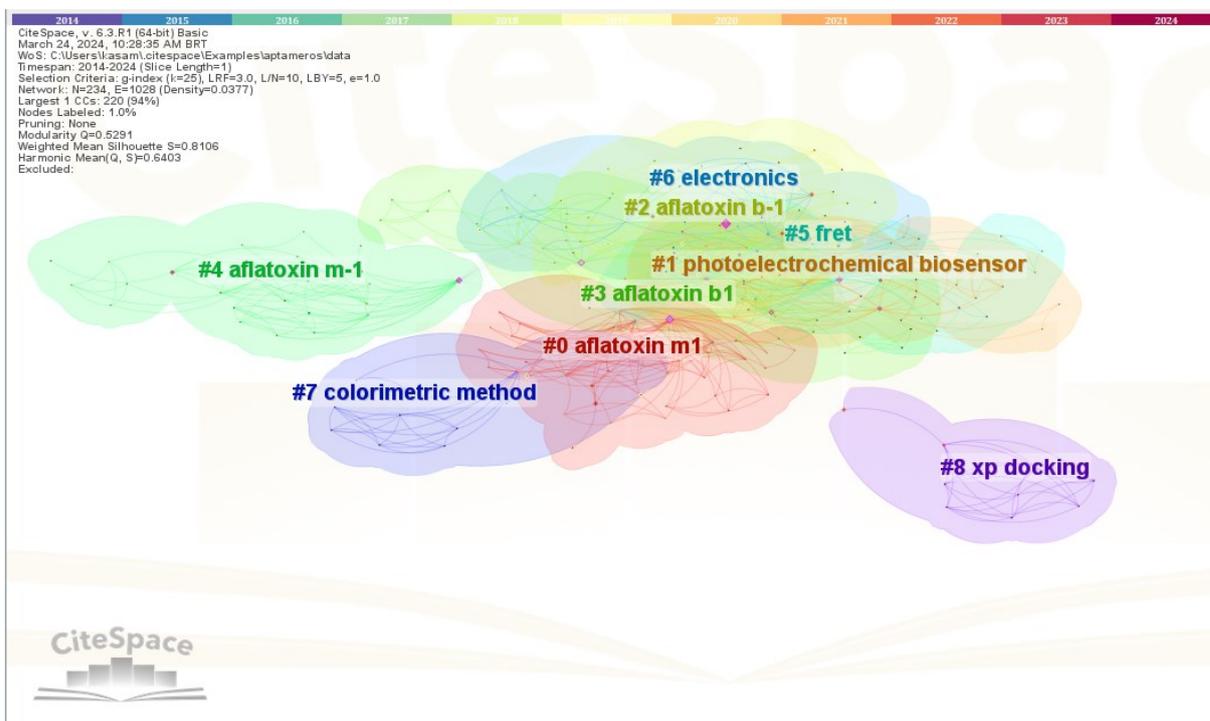


Fonte: Wos (2024)

Para obter mais métricas, foi utilizado o software CiteSpace (CHEN, 2024) que processa a entropia informacional baseada em frases substantivas extraídas de registros para representar a diversidade de um conjunto de dados. A centralidade de intermediação de um nó em uma rede, mede o grau em que o nó é parte dos caminhos que conectam um par arbitrário de nós na rede. A modularidade “Q” de uma rede mede a extensão em que uma rede pode ser decomposta em vários componentes, ou módulos. O valor de uma silhueta média ponderada “S” de um cluster mede a qualidade de configuração de cluster (desde que tenham tamanhos semelhantes), seu valor varia entre -1 e 1 e quanto mais alto representa uma solução perfeita; todos acima são métricas que informam sobre as propriedades estruturais globais da rede (CHEN, 2006). De acordo com a assinatura de rede das figuras do CiteSpace (CHEN, 2024), a modularidade $Q=0,5291$ está abaixo do esperado (60%) indicando que os grupamentos não são robustos e o ponto que a rede pode ser decomposta é baixo; considera-se e a silhueta média ponderada $S=0,8106$ elevada, e ela indica que quanto mais consistentes são os membros do *cluster*, quanto maior a homogeneidade destes aglomerados em média. A Média harmônica (W,S) obtida foi de 0,6403 e ela tende a minimizar o impacto de *outliers* elevados e aumentar os baixos, ou seja, se um conjunto de dados não idênticos é submetido a um "espalhamento", a média harmônica faz o ajuste preservando a representatividade e homogeneidade.

Com o uso do software CiteSpace houve destaque das palavras-chave: AFM1, biossensor fotoeletroquímico, AFB1, FRET, eletrônicos, métodos colorimétricos e ancoragem xp (Figura 13).

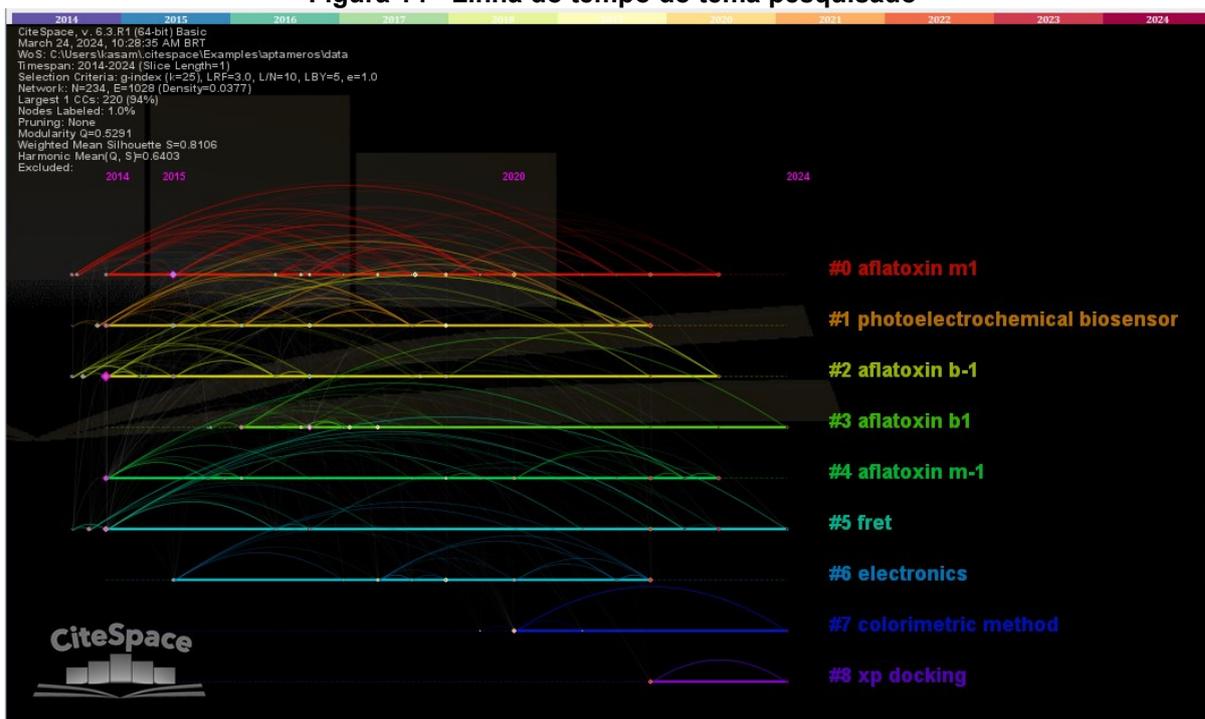
Figura 13 - Principais palavras-chave do estudo



Fonte: CHEN (2024)

A linha do tempo (Figura 14) mostra que estudos de ancoragem xp são bem recentes, assim como o foco em metodologias colorimétricas e FRET, que apesar de serem conhecidas a mais tempo, estão em evidência, atualmente. Um dos motivos das pesquisas de testes colorimétricos estarem sendo feitas é o anseio de equipamentos portáteis, de fácil utilização e visualização do resultado, rápidos, robustos e sensíveis, ou seja, análises que dependam cada vez menos de equipamentos grandes, caros e complexos. Ainda na mesma figura, verifica-se a importância do tema AFs e que elas continuam sendo muito estudadas.

Figura 14 - Linha do tempo do tema pesquisado



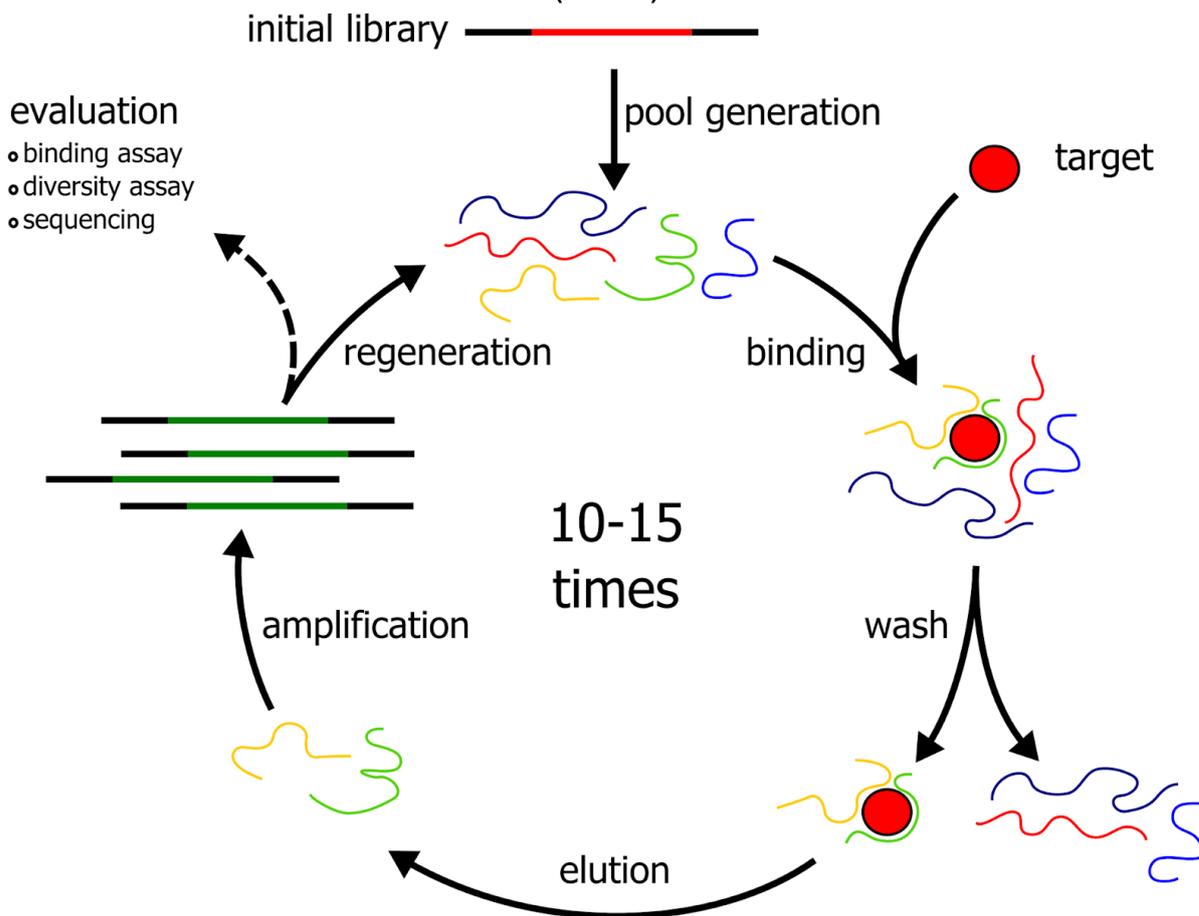
Fonte: Chen (2024)

A bioinformática estuda e organiza informações biológicas. As ferramentas da bioinformática são de grande importância nos processos de integração de dados para seleção e aprimoramento de aptâmeros, conferindo especificidade, sensibilidade e funcionalização.

Os aptâmeros são uma classe de elementos de bioreconhecimento gerados *in vitro* por meio da Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX - *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) (Figura 15) sendo uma técnica de biologia molecular utilizada para sintetizar oligonucleotídeos RNA ou DNA de cadeia simples (ssDNA) ou dupla DNA (dsDNA) por meio de amplificação (PCR), a partir de uma biblioteca de DNA e *primers* aleatórios, cuja complexidade e diversidade é dependente do número de posições de nucleotídeos aleatórios. Durante o procedimento SELEX a biblioteca aleatória de oligonucleotídeos é exposta à molécula alvo sob condições de pH, força iônica e temperatura pré-determinadas. Uma vantagem dos aptâmeros sobre os anticorpos é por ser feito *in vitro*, em que as condições podem ser racionalmente planejadas e adequadas ao cenário de teste. Para micotoxinas geralmente imobiliza-se o alvo de interesse numa fase sólida, para posterior remoção das sequências indesejadas, e

posterior seleção e caracterização de suas propriedades, como a afinidade de ligação de proteínas, peptídeos, DNA ou RNA (DANESH *et al.*, 2018; RUSCITO *et al.*, 2016; SCHÜTZE *et al.*, 2011).

Figura 15 - Processo da Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX)



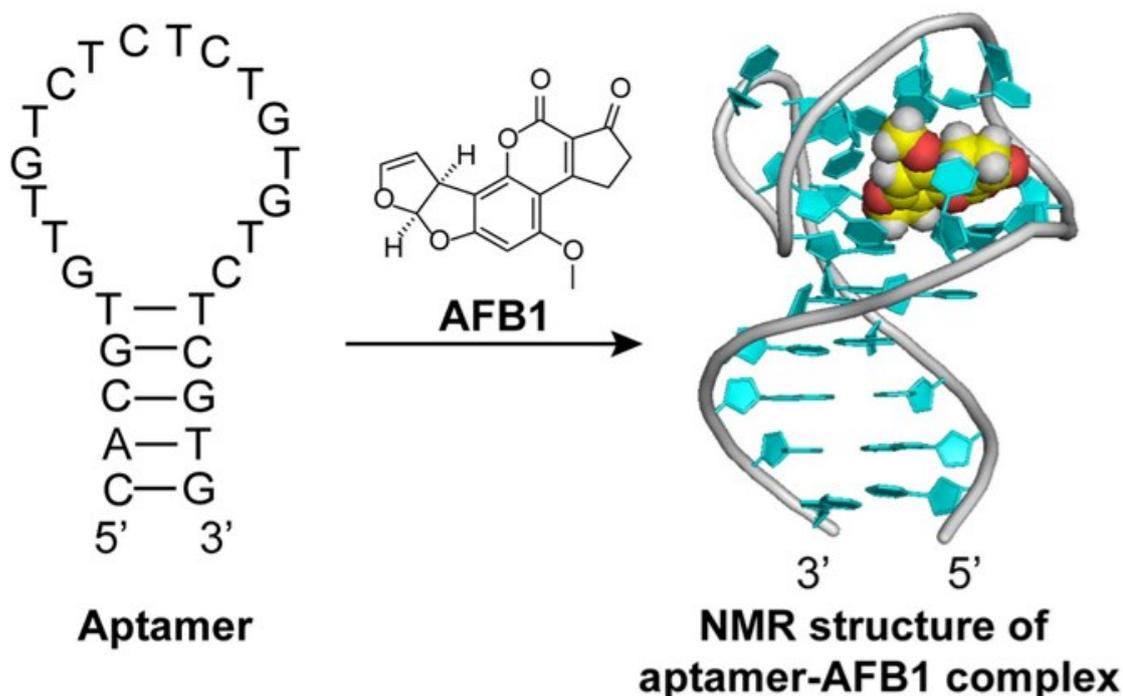
Fonte: Schütze *et al.*, (2011)

Dos artigos que compõem este estudo, foram recuperados doze (12) que utilizaram a ferramenta SELEX para determinar o aptâmero do biosensor (LI; PEI; WANG, 2022; LIU *et al.*, 2022b; MA *et al.*, 2014; MALHOTRA *et al.*, 2014; MUKHERJEE; BHATT; H.K., 2017; SETLEM *et al.*, 2016; WANG; SUN; ZHAO, 2019; WU *et al.*, 2019; YE *et al.*, 2019), entretanto Chen (2022b), Danesh *et al.* (2018) e Ruscito *et al.* (2016) foram excluídos por se tratarem de artigos de revisão. (CHEN, 2022; DANESH *et al.*, 2018; RUSCITO *et al.*, 2016).

A ligação do aptâmero 26-mer DNA a AFB1 pode ser demonstrada pela Figura 16. Apesar de sua estrutura em alça (“grampo”), a base molecular de sua alta

afinidade permanece desconhecida. Os aptâmeros para moléculas pequenas geralmente tem constante de dissociação (K_d) ao nível de μMol ou menor, e poucos grupo funcionais, entretanto poucos aptâmeros para moléculas pequenas exibem forte afinidade com valores de K_d em nMol (XU *et al.*, 2023).

Figura 16 - Ligação da AFB1 ao aptâmero

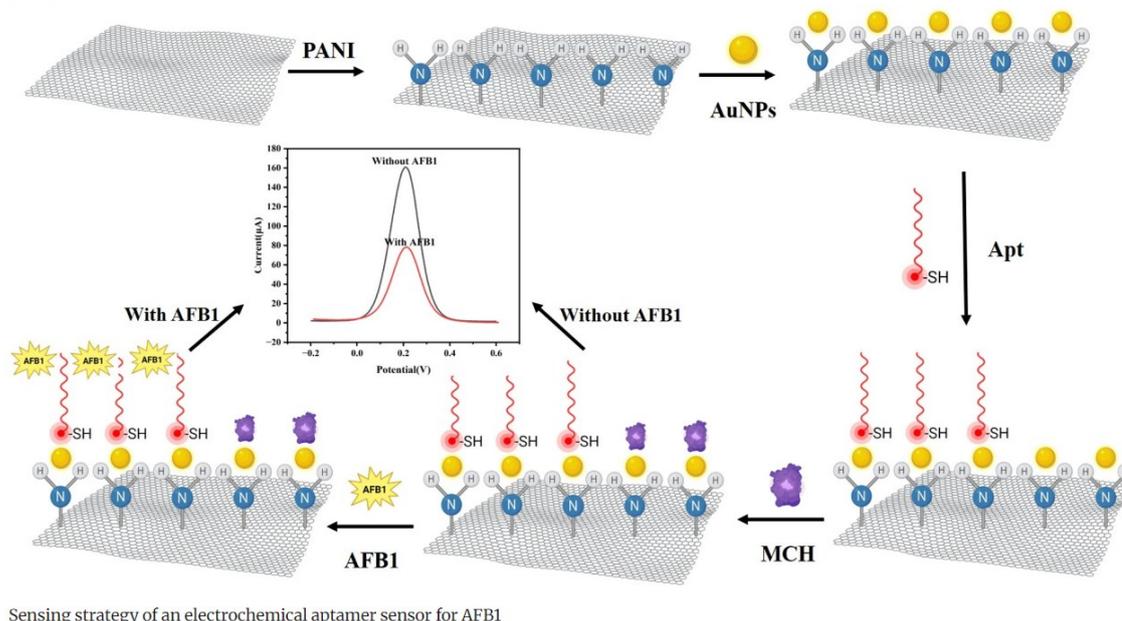


Fonte: XU *et al.*, (2023)

Um termo muito frequente foi “*sensor” (aptasensor, nanosensor, biosensor, etc). Para melhor compreensão de nanosensor, a Figura 17 representa um diagrama esquemático de um aptasensor eletroquímico que foi criado usando um eletrodo de carbono vítreo funcionalizado com polianilina (PANI)-óxido de grafeno (GO) e nanopartículas de ouro (AuNPs). O 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) é usado para bloquear sítios de ligação não específicos do aptâmero (LI *et al.*, 2024).

Figura 17 - Diagrama esquemático de aptasensor eletroquímico.
Scheme 1

From: A novel electrochemical aptasensor based on AuNPs-loaded graphene oxide-polyaniline for sensitive detection of aflatoxin B1



Fonte: Li et al., (2024)

Grande parte dos materiais utilizados para os biosensores são nano compostos (NCs) em suas mais diversas formas (nanoshits, nanoparticles, nanotubes, nanocubes, nanowires, nanoflowers, etc), os quais são imobilizados sobre diferentes superfícies, sendo os nanocompostos de ouro (AuNCs) o metal mais citado (vinte e dois resultados), seguido pelo NCs de prata com quatro resultados, e sílica com dois. As nanopartículas (NPs) e NCs são utilizados para amplificar o sinal, fornecer uma melhor resolução.

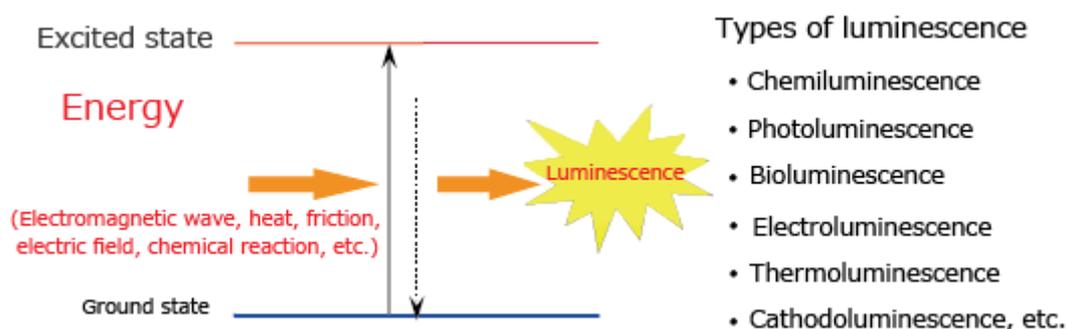
Os polímeros molecularmente impressos MIPs (*molecularly imprinted polymers*) possuem cavidades em sua matriz com afinidade para uma molécula alvo e são citados por Serebrennikova et al. (2023), Chi e Liu (2023), Fan et al. (2023) e Roushani, Farokhi e Rahmati. (2022). (CHI; LIU, 2023; FAN et al., 2023; ROUSHANI; FAROKHI; RAHMATI, 2022; SEREBRENNIKOVA et al., 2023).

Os pontos quânticos QD (*quantum dots*) são citados por 9 autores (CAI et al., 2022; LI et al., 2022; LU et al., 2019, 2020, 2022; MUKHERJEE; BHATT; H.K., 2017; QIAN et al., 2020; RAMALINGAM; ELSAYED; SINGH, 2023; SABET et al., 2017).

Rahmani *et al.* (2021) realizou eletrofiação de nanofibra de carbono para desenvolver um aptasensor eletroquímico para AFM1 (RAHMANI *et al.*, 2021).

Luminescência é a emissão de luz em consequência de excitação da substância (sem emissão de calor); se a excitação for consequência de uma reação química (por exemplo, luminol +peróxido) é a quimioluminescência, se for decorrente de reações redox é eletroquimioluminescência; ela é fotoeletroquímica (PEC) se o processo é capaz de produzir energia utilizando luz do espectro solar ou corante e um semicondutor; a fotoluminescência ocorre quando há absorção de luz e exibe emissão de fótons (fluorescência e fosforescência) (Figura 18) (SHIMADZU, [s.d.]).

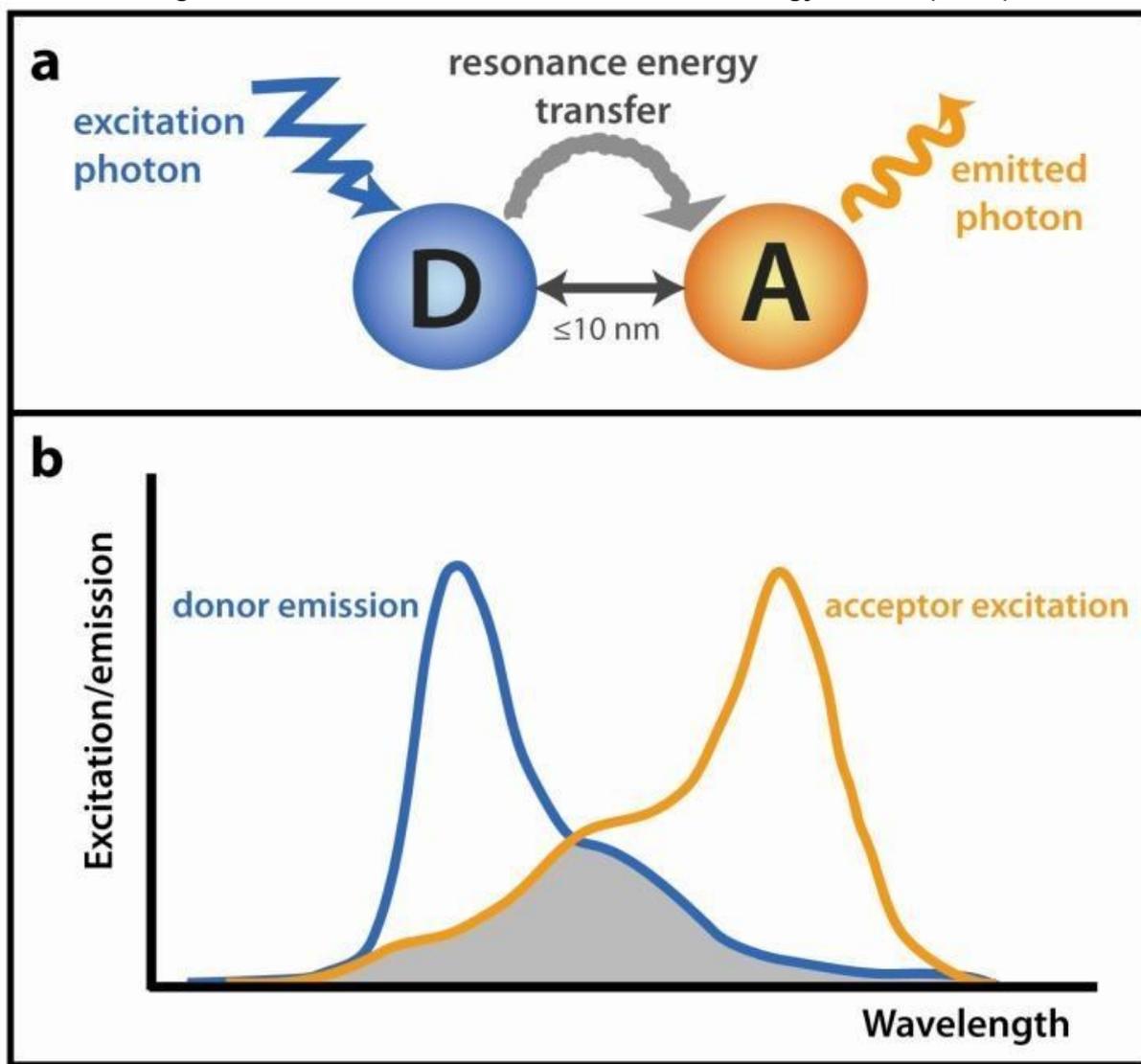
Figura 18 - Fenômeno de luminescência.



Fonte: Shimadzu[s.d.]

A transferência de energia de ressonância por fluorescência FRET (*Förster resonance energy transfer*) é a transferência de energia de forma não radiativa entre dois cromóforos sem a necessidade de reabsorção de radiação eletromagnética, é um processo físico dependente da distância entre os fluoróforos (Figura 19) (STEJSKALOVA; STANEK, 2012). Foram encontrados sete (07) artigos (LU *et al.*, 2019; NASIRIAN *et al.*, 2017; SABET *et al.*, 2017; SEREBRENNIKOVA *et al.*, 2023), sendo uma revisão (LI *et al.*, 2023), uma técnica de transferência de energia ressonante por luminescência LRET (*luminescence resonance energy transfer*) (WANG *et al.*, 2019) e outro com utilização de corantes de emissão induzida por agregação como sondas marcadoras de ácidos nucleicos (ZHAO *et al.*, 2019). Outro autor que citou o uso de corantes alocricos foi Hao *et al.* (2018) (HAO *et al.*, 2018).

Figura 19 - Fundamentos do Förster resonance energy transfer (FRET)



Fonte: STEJSKALOVA; STANEK, (2012)

Os estudos de “*docking*” (ancoragem) molecular e simulações com cálculos de energia livre e dinâmica molecular estão relacionados com a bioinformática. Asmare et al. (2024) fez uso das ferramentas da bioinformática para fazer a triagem e identificação de aptâmeros que pudessem se ligar a AFB₁. O resultado obtido foi uma sequência de 34 nucleotídeos (5'-ATCCTGTGAGGAATGCTCATGCATAGCAAGGGCT-3') com um escore de 5.959 kcal/mol (ASMARE et al., 2024). Niu et al. (2024) desenhou grampos para uso em configuração de sítio catalítico (NIU et al., 2024). Fan et al. (2024) estudou interação de aptâmeros com AFB₁ usando dicroísmo circular, dinâmica molecular, ancoragem molecular e análise fluorescente (FAN et al., 2024). O estudo da afinidade de pequenos aptâmeros pela avaliação do equilíbrio de dissociação foi feito por Wang

et al. (2023) (WANG *et al.*, 2023). Autores além dos citados acima que são selecionados ao fazer refinamento no WOS: Estes são outros autores que publicaram sobre ancoragem molecular (KUNENE *et al.*, 2023; LI; PEI; WANG, 2022; LIU *et al.*, 2022a, 2022b; YANG *et al.*, 2020; ZHAN *et al.*, 2022).

A técnica de CRISPR-Cas12a foi utilizada para editar 28 crRNAs para hibridizar com toda região do aptâmero AFB₁-47nt para estudo de afinidade (NIU; XING; ZHANG, 2023)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se um viés quando se trata dos artigos mais citados. É frequente que os mais citados sejam os publicados há mais tempo, por isso uma linha do tempo fornece uma perspectiva do que está sendo publicado mais recentemente.

A opção de adquirir aptâmeros prontos é uma das comodidades/facilidades das ferramentas biomoleculares. Entretanto a funcionalização dos mesmos ainda demanda pesquisa

A busca de metodologias acessíveis com equipamentos de fácil manuseio e baixo custo ainda é uma meta a ser alcançada.

Apesar de ser um tema conhecido há mais de meio século, ainda existem gargalos em sua detecção. Atualmente ainda existem casos de intoxicações por aflatoxinas e outras micotoxinas. A exposição pode passar despercebida, mas em longo prazo tem efeitos deletérios como o carcinoma hepático. Em animais de corte, ou leiteiro também causam prejuízos financeiros.

Os estudos computacionais e simulações são recentes e são tendência pois não necessitam de estudos in vivo.

REFERÊNCIAS

ACUR, A. et al. Genetic diversity of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* isolated from selected groundnut growing agro-ecological zones of Uganda. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 252, 14 ago. 2020.

Aflatoxin: An Old Carcinogen Teaches Us New Tricks. , 21 mar. 2017. Disponível em: <<https://videocast.nih.gov/watch=21944>>. Acesso em: 23 mar. 2024

ALGAMMAL, A. M. et al. Molecular and HPLC-based approaches for detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A released from toxigenic *Aspergillus* species in processed meat. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021.

ASMARE, M. et al. Computer aided aptamer selection for fabrication of electrochemical sensor to detect Aflatoxin B1. **Journal Of Biomolecular Structure & Dynamics**, 22 jan. 2024.

BENKERROUM, N. Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 2, 2020.

BRASIL. **Ministério da Agricultura. Portaria MA/SNAD/SFA n. 07, de 09/11/88.** , 1988.

BRASIL. **Instrução Normativa No 30, De 5 De Agosto De 2009.** , 2009. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-30-de-5-de-agosto-de-2009.pdf/view>>

BRASIL. **Instrução normativa - IN n. 160, de 1º de julho de 2022. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Brasília: Casa Civil, 2022.** Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/instrucao-normativa-anvisa-2022_160-1.pdf/view>. Acesso em: 7 mar. 2024

CACERES, I. et al. Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. **Toxins**, v. 12, n. 3, 28 fev. 2020.

CAI, Q. et al. Versatile Photoelectrochemical Biosensing for Hg²⁺ and Aflatoxin B1 Based on Enhanced Photocurrent of AgInS₂ Quantum Dot-DNA Nanowires Sensitizing NPC-ZnO Nanopolyhedra. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 15, p. 5814–5822, 19 abr. 2022.

CAMILETTI, B. X. et al. Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section Flavi isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions. **Crop Protection**, v. 92, p. 41–48, 2017.

CARY, J. W. et al. Generation of aflR disruption mutants of *Aspergillus parasiticus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 680–684, 1 jun. 2000.

CHANG, P.-K. et al. Understanding nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 977–984, out. 2007.

CHEN. **CiteSpace Software v.6.3.R1 (64-bit) Basic.** , 2024.

CHEN, C. CiteSpace II: Detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature. v. 57(3), p. 359–377, 2006.

CHEN, Y. Recent progress in fluorescent aptasensors for the detection of aflatoxin B1 in food. **Analytical Methods**, v. 14, n. 2, p. 86–96, 6 jan. 2022.

CHI, H.; LIU, G. A fluorometric sandwich biosensor based on molecular imprinted polymer and aptamer modified CdTe/ZnS for detection of aflatoxin B1 in edible oil. **LWT**, v. 180, p. 114726, 15 abr. 2023.

CIMBALO, A. et al. Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. **Food And Chemical Toxicology: An International Journal Published For The British Industrial Biological Research Association**, v. 137, p. 111161, mar. 2020.

DANESH, N. et al. Ultrasensitive detection of aflatoxin B1 and its major metabolite aflatoxin M1 using aptasensors: A review. **TRAC-Trends In Analytical Chemistry**, v. 99, p. 117–128, fev. 2018.

ESKOLA, M. et al. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate” of 25. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2773–2789, 2020.

FAN, L. et al. Dummy molecularly imprinted solid-phase extraction-SERS determination of AFB1 in peanut. **Spectrochimica Acta Part A-Molecular And Biomolecular Spectroscopy**, v. 288, 5 mar. 2023.

FAN, Y. et al. A novel Recjf Exo signal amplification strategy based on bioinformatics-assisted truncated aptamer for efficient fluorescence detection of AFB1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, p. 128061, 1 jan. 2024.

FDA. **CPG Sec. 683.100 Action Levels for Aflatoxins in Animal Feeds.** , 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-683100-action-levels-aflatoxins-animal-feeds>>

HAO, N. et al. A pH-Resolved Colorimetric Biosensor for Simultaneous Multiple Target Detection. **ACS Sensors**, v. 3, n. 10, p. 2159–2165, 26 out. 2018.

KJÆRBØLLING, I. et al. A comparative genomics study of 23 *Aspergillus* species from section Flavi. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1106, 27 fev. 2020.

KUNENE, K. et al. Smart electrochemical immunosensing of aflatoxin B1 based on a palladium nanoparticle-boron nitride-coated carbon felt electrode for the wine industry. **Talanta**, v. 253, 1 fev. 2023.

LAMIC. **Laboratório de Análises Micotoxicológicas**. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/>>.

LI, J. et al. Fluorescence-based aptasensors for small molecular food contaminants: From energy transfer to optical polarization. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 285, p. 121872, 15 jan. 2023.

LI, N. et al. A novel electrochemical aptasensor based on AuNPs-loaded graphene oxide-polyaniline for sensitive detection of aflatoxin B1. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 22 jan. 2024.

LI, W.; PEI, Y.; WANG, J. Development and analysis of a novel AF11-2 aptamer capable of enhancing the fluorescence of aflatoxin B1. **Chinese Chemical Letters**, v. 33, n. 8, p. 4096–4100, ago. 2022.

LI, Y. et al. Regulation of Ru(bpy)₃²⁺ Electrochemiluminescence Based on Distance-Dependent Electron Transfer of Ferrocene for Dual-Signal Readout Detection of Aflatoxin B1 with High Sensitivity. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 1294–1301, 18 jan. 2022.

LIAO, J. et al. A review on biosynthesis and genetic regulation of aflatoxin production by major *Aspergillus* fungi. **Oil Crop Science**, v. 5, n. 4, p. 166–173, 1 out. 2020.

LIU, B. et al. A novel screening on the specific peptide by molecular simulation and development of the electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 in grains. **Food Chemistry**, v. 372, 15 mar. 2022a.

LIU, R. et al. Selection and Characterization of DNA Aptamers for Constructing Aptamer-AuNPs Colorimetric Method for Detection of AFM1. **Foods**, v. 11, n. 12, jun. 2022b.

LU, X. et al. Target-driven switch-on fluorescence aptasensor for trace aflatoxin B1 determination based on highly fluorescent ternary CdZnTe quantum dots. **Analytica Chimica Acta**, v. 1047, p. 163–171, 24 jan. 2019.

LU, Y. et al. An electrochemiluminescence aptasensor for the ultrasensitive detection of aflatoxin B1 based on gold nanorods/graphene quantum dots-modified poly(indole-6-carboxylic acid)/flower-gold nanocomposite. **Microchemical Journal**, v. 157, set. 2020.

LU, Y. et al. Quantum dot microsphere-based immunochromatography test strip enabled sensitive and quantitative on-site detections for multiple mycotoxins in grains. **Food Chemistry**, v. 376, 15 maio 2022.

MA, X. et al. Selection, identification, and application of Aflatoxin B1 aptamer. **European Food Research And Technology**, v. 238, n. 6, p. 919–925, jun. 2014.

MA, Y. et al. Multi-omics analysis of the metabolism of phenolic compounds in tea leaves by *Aspergillus luchuensis* during fermentation of pu-erh tea. **Food Research International**, v. 162, p. 111981, 1 dez. 2022.

MALHOTRA, S. et al. Selection of aptamers for aflatoxin M1 and their characterization. **Journal Of Molecular Recognition**, v. 27, n. 8, p. 493–500, ago. 2014.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 1 out. 2013.

MARTÍN-CARRASCO, I. et al. Comparison between pollutants found in breast milk and infant formula in the last decade: A review. **Science of The Total Environment**, v. 875, p. 162461, 1 jun. 2023.

MARTÍNEZ, J. et al. Computational Studies of Aflatoxin B(1) (AFB(1)): A Review. **Toxins**, v. 15, n. 2, 7 fev. 2023.

MARTINS, C. et al. Are Data from Mycotoxins' Urinary Biomarkers and Food Surveys Linked? A Review Underneath Risk Assessment. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 373–398, 19 maio 2021.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, p. e1000097, 21 jul. 2009.

MUKHERJEE, M.; BHATT, P.; H.K., M. Fluorescent competitive aptasensor for detection of aflatoxin B1. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, n. 12, p. e2650, 1 dez. 2017.

NASIRIAN, V. et al. Ultrasensitive aflatoxin B1 assay based on FRET from aptamer labelled fluorescent polymer dots to silver nanoparticles labeled with complementary DNA. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 12, p. 4655–4662, dez. 2017.

NIESSEN, L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi. **Advances In Food And Nutrition Research**, v. 54, p. 81–138, 2008.

NIU, C.; XING, X.; ZHANG, C. A novel strategy for analyzing aptamer dominated sites and detecting AFB1 based on CRISPR-Cas12a. **Sensors & Diagnostics**, v. 2, n. 1, p. 155–162, 19 jan. 2023.

NIU, X. et al. Self-assembled programmable DNA nanoflower for in situ synthesis of gold nanoclusters and integration with Mn-MOF to sensitively detect AFB1. **Chemical Engineering Journal**, v. 479, p. 147806, 1 jan. 2024.

ONO, L. T. et al. Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Brazilian cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and products. **Mycotoxin Research**, v. 37, n. 3, p. 221–228, 1 ago. 2021.

PICKOVA, D. et al. Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation. **Toxins**, v. 13, n. 6, 3 jun. 2021.

PRIYANKA, S. R. et al. Occurrence and molecular detection of toxigenic Aspergillus species in food grain samples from India. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 537–543, fev. 2014.

QIAN, J. et al. Bi-color FRET from two nano-donors to a single nano-acceptor: A universal aptasensing platform for simultaneous determination of dual targets. **Chemical Engineering Journal**, v. 401, p. 126017, 1 dez. 2020.

RAHMANI, H. et al. Development of electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles and electrospun carbon nanofibers for the detection of aflatoxin M1 in milk. **Journal Of Food Measurement And Characterization**, v. 15, n. 2, p. 1826–1833, abr. 2021.

RAMALINGAM, S.; ELSAYED, A.; SINGH, A. An Aflatoxin-M1 biochip using graphene quantum dot-gold hybrid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 403, 1 mar. 2023.

ROUSHANI, M.; FAROKHI, S.; RAHMATI, Z. Development of a dual-recognition strategy for the aflatoxin B1 detection based on a hybrid of aptamer-MIP using a Cu₂O NCs/GCE. **Microchemical Journal**, v. 178, jul. 2022.

RUAN, H. et al. Hepatotoxicity of food-borne mycotoxins: molecular mechanism, anti-hepatotoxic medicines and target prediction. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 62, n. 9, p. 2281–2308, 2022.

RUSCITO, A. et al. Current Status and Future Prospects for Aptamer-Based Mycotoxin Detection. **Journal Of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 865–877, jul. 2016.

SABET, F. S. et al. FRET-based aptamer biosensor for selective and sensitive detection of aflatoxin B1 in peanut and rice. **Food Chemistry**, v. 220, p. 527–532, 1 abr. 2017.

SCHÜTZE, T. et al. Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e29604, 29 dez. 2011.

SEREBRENNIKOVA, K. V. et al. A Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for Aflatoxin B1 Based on Ligand-Induced ssDNA Displacement. **Molecules**, v. 28, n. 23, p. 7889, jan. 2023.

SETLEM, K. et al. Immuno Affinity SELEX for Simple, Rapid, and Cost-Effective Aptamer Enrichment and Identification against Aflatoxin B1. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, 1 dez. 2016.

SHIMADZU. **About Chemiluminescence Detection**. Disponível em: <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/chemiluminescence_detection.html>. Acesso em: 23 mar. 2024.

SKERKER, J. M. et al. Chromosome assembled and annotated genome sequence of *Aspergillus flavus* NRRL 3357. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 11, n. 8, p. jkab213, 1 ago. 2021.

STEJSKALOVA, E.; STANEK, D. Probing Nucleic Acid Interactions and Pre-mRNA Splicing by Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 13, p. 14929–45, 1 dez. 2012.

THAKARE, D. et al. Aflatoxin-free transgenic maize using host-induced gene silencing. **Science Advances**, v. 3, n. 3, p. e1602382, [s.d.].

TURNER, N. W. et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). **Analytica Chimica Acta**, v. 901, p. 12–33, 11 dez. 2015.

UNIÃO EUROPÉIA. **Diretiva 2002/32/EC do Parlamento Europeu e do Conselho de 7 de maio de 2002 relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais - declaração do conselho. União Européia**, 2002. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32002L0032>>

UNIÃO EUROPÉIA. **Regulamento (UE) 2023/915 da Comissão de 25 de abril de 2023 relativo aos teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (CE) n.o 1881/2006. União Européia**, 2023. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0915&qid=1692107082886>>

USA. **FDA Guidance for Industry: Action levels for poisonous or deleterious substances in human food and animal feed.** , 2020. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed#afla>>

VIDAL, J. et al. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 49, p. 146–158, 15 nov. 2013.

WANG, C.; SUN, L.; ZHAO, Q. A simple aptamer molecular beacon assay for rapid detection of aflatoxin B1. **Chinese Chemical Letters**, v. 30, n. 5, p. 1017–1020, maio 2019.

WANG, F. et al. Single-Particle LRET Aptasensor for the Sensitive Detection of Aflatoxin B 1 with Upconversion Nanoparticles. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 18, p. 11856–11863, 17 set. 2019.

WANG, L. et al. Investigation on small molecule-aptamer dissociation equilibria based on antisense displacement probe. **Food Science and Human Wellness**, v. 12, n. 4, p. 1257–1264, 1 jul. 2023.

WIKANDARI, R. et al. Assessment of Microbiological Quality and Mycotoxin in Dried Chili by Morphological Identification, Molecular Detection, and Chromatography Analysis. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 17, n. 6, 12 mar. 2020.

WOS. **Web of Science Clarivate.** , 2024. Disponível em: <<https://www.webofscience.com/>>

WU, S. et al. Electrochemical aptasensor for aflatoxin B1 based on smart host-guest recognition of β -cyclodextrin polymer. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 129, p. 58–63, 15 mar. 2019.

XIE, H. et al. Fungi population metabolomics and molecular network study reveal novel biomarkers for early detection of aflatoxigenic *Aspergillus* species. **Journal of hazardous materials**, v. 424, n. Pt A, p. 127173, 15 fev. 2022.

XU, G. et al. Structural basis for high-affinity recognition of aflatoxin B1 by a DNA aptamer. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 14, p. 7666–7674, 11 ago. 2023.

YANG, Y. et al. Development of a chimeric aptamer and an AuNPs aptasensor for highly sensitive and specific identification of Aflatoxin B1. **Sensors And Actuators B-Chemical**, v. 319, 15 set. 2020.

YASEEN, S.; HANANO, A. Quantitative PCR (qPCR) Reveals that the Aflatoxin-Free Pistachio Samples Can Be Potentially Contaminated with Fungal Materials. **Food Analytical Methods**, v. 15, n. 10, p. 2703–2711, 1 out. 2022.

YE, H. et al. GO-amplified fluorescence polarization assay for high-sensitivity detection of aflatoxin B1 with low dosage aptamer probe. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 5, p. 1107–1115, fev. 2019.

ZHAN, H. et al. A highly sensitive competitive aptasensor for AFB1 detection based on an exonuclease-assisted target recycling amplification strategy. **Analytical Methods**, v. 15, n. 1, p. 70–78, 22 dez. 2022.

ZHAO, Z. et al. Intrinsic conformation response-leveraged aptamer probe based on aggregation-induced emission dyes for aflatoxin B1 detection. **Dyes and Pigments**, v. 171, p. 107767, 1 dez. 2019.