

# Evolução na Ciência e Engenharia de Materiais

Henrique Ajuz Holzmann  
(Organizador)



**Atena**  
Editora

Ano 2020

# Evolução na Ciência e Engenharia de Materiais

Henrique Ajuz Holzmann  
(Organizador)



**Atena**  
Editora

Ano 2020

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação:** Karine de Lima

**Edição de Arte:** Lorena Prestes

**Revisão:** Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
 Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
 Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
 Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
 Prof<sup>a</sup> Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
 Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
 Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Prof<sup>a</sup> Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
 Prof<sup>a</sup> Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
 Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
 Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá  
 Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
 Prof<sup>a</sup> Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
 Prof<sup>a</sup> Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

E93      Evolução na ciência e engenharia de materiais [recurso eletrônico] /  
 Organizador Henrique Ajuz Holzmann. – Ponta Grossa, PR:  
 Atena Editora, 2020.

Formato: PDF  
 Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader  
 Modo de acesso: World Wide Web  
 Inclui bibliografia  
 ISBN 978-85-7247-921-9  
 DOI 10.22533/at.ed.219201601

1. Engenharia de materiais – Pesquisa – Brasil. I. Holzmann,  
 Henrique Ajuz.

CDD 620.11

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

Atena Editora  
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

A engenharia de materiais, se tornou um dos grandes pilares da revolução técnica industrial, devido a necessidade de desenvolvimento de novos materiais, que apresentem melhores características e propriedades físico-químicas. Grandes empresas e centros de pesquisa investem maciçamente em setores de P&D a fim de tornarem seus produtos e suas tecnologias mais competitivas.

Destaca-se que a área de material compreende três grandes grupos, a dos metais, das cerâmicas e dos polímeros, sendo que cada um deles tem sua importância na geração de tecnologia e no desenvolvimento dos produtos. Aliar os conhecimentos pré-existentes com novas tecnologias é um dos grandes desafios da nova engenharia.

Neste livro são explorados trabalhos teóricos e práticos, relacionados as áreas de materiais, dando um panorama dos assuntos em pesquisa atualmente. Apresenta capítulos relacionados ao desenvolvimento de novos materiais, com aplicações nos mais diversos ramos da ciência, bem como assuntos relacionados a melhoria em processos e produtos já existentes, buscando uma melhoria e a redução dos custos.

De abordagem objetiva, a obra se mostra de grande relevância para graduandos, alunos de pós-graduação, docentes e profissionais, apresentando temáticas e metodologias diversificadas, em situações reais.

Boa leitura!

Henrique Ajuz Holzmann

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1</b> .....  | <b>1</b>  |
| INFLUÊNCIA DO ESPAÇAMENTO DE FIBRAS VEGETAIS NA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E MORFOLOGIA DA FRATURA DE COMPÓSITOS COM FIBRAS CONTÍNUAS E ALINHADAS                |           |
| Fábio Santos de Sousa<br>Edwillson Gonçalves de Oliveira Filho<br>Luciano Monteiro Almeida<br>Roberto Tetsuo Fujiyama                                      |           |
| <b>DOI 10.22533/at.ed.2192016011</b>   |           |
| <b>CAPÍTULO 2</b> .....  | <b>10</b> |
| COMPÓSITOS POLIMÉRICOS HÍBRIDOS COM FIBRAS NATURAIS E SINTÉTICAS CONTÍNUAS E ALINHADAS   |           |
| Luciano Monteiro Almeida<br>César Tadeu Nasser Medeiros Branco<br>Douglas Santos Silva<br>Edwillson Gonçalves de Oliveira Filho<br>Roberto Tetsuo Fujiyama |           |
| <b>DOI 10.22533/at.ed.2192016012</b>   |           |
| <b>CAPÍTULO 3</b> .....  | <b>23</b> |
| CARACTERIZAÇÃO DE NANOFILTRO REDUTOR DE SULFETO DE HIDROGÊNIO E UMIDADE DO BIOGÁS  |           |
| Mateus Sousa Pinheiro<br>Gabrielle Dias Coelho<br>Maria del Pilar Hidalgo Falla  |           |
| <b>DOI 10.22533/at.ed.2192016013</b>   |           |
| <b>CAPÍTULO 4</b> .....  | <b>36</b> |
| DESCRIÇÃO TERMODINÂMICA DE MICRODOMÍNIOS DENTRO DE PICHE MESOFÁSICO PRECURSOR PARA FIBRAS DE CARBONO   |           |
| Caio Cesar Ferreira Florindo<br>Adalberto Bono Maurizio Sacchi Bassi   |           |
| <b>DOI 10.22533/at.ed.2192016014</b>   |           |
| <b>CAPÍTULO 5</b> .....  | <b>51</b> |
| NANOBIOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM APTAMERO PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A EM CAFÉ TORRADO  |           |
| Maurília Palmeira da Costa<br>Itala Gabriela Tavares Lima<br>Idjane Silva de Oliveira<br>Cesar Augusto Souza de Andrade<br>Maria Danielly Lima de Oliveira |           |
| <b>DOI 10.22533/at.ed.2192016015</b>   |           |

**CAPÍTULO 6 ..... 63**

DETECÇÃO ESPECÍFICA DE SCHISTOSOMA MANSONI EM LCR USANDO UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE DNA BASEADO EM NANOPARTICULAS DE OURO E MERCAPTOSILANO

Giselle Soares dos Santos  
César Augusto Sousa de Andrade  
Fábio Lopes de Melo  
Maria Danielly Lima de Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.2192016016**

**CAPÍTULO 7 ..... 73**

PRODUÇÃO DE NANOMATERIAIS BIOMIMÉTICOS A PARTIR DE UM NOVO SISTEMA DE *ELECTROSPINNING* PARA ENGENHARIA DE TECIDOS DOS MENISCOS DO JOELHO

Thiago Domingues Stocco  
Anderson de Oliveira Lobo

**DOI 10.22533/at.ed.2192016017**

**CAPÍTULO 8 ..... 87**

PLATAFORMA NANOSTRUTURADA BASEADA EM APTÂMERO PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A

Maurília Palmeira da Costa  
Ítala Gabriela Tavares Lima  
Idjane Silva de Oliveira  
Cesar Augusto Souza de Andrade  
Maria Danielly Lima de Oliveira

**DOI 10.22533/at.ed.2192016018**

**CAPÍTULO 9 ..... 96**

CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS PLA/ZNO POR REOLOGIA E NMR NO DOMÍNIO DO TEMPO

Amanda Ramos Aragão Melo  
José Carlos Dutra Filho  
Maria Inês Bruno Tavares

**DOI 10.22533/at.ed.2192016019**

**CAPÍTULO 10 ..... 108**

INFLUÊNCIA DA SUBSTITUIÇÃO DE CÁLCIO E BÁRIO EM COMPOSIÇÕES DE PEROVSKITAS  $TR_{(1-x)}M_xO_3$  (TR= PR, GD), (M = CA, BA) (X= 0,2) NA ATIVIDADE CATALÍTICA

Cássia Carla de Carvalho  
Anderson Costa Marques  
Symone Leandro de Castro  
Davidson Nunes de Oliveira  
Filipe Martel de Magalhães Borges  
Alexandre de Sousa Campos

**DOI 10.22533/at.ed.21920160110**

**CAPÍTULO 11 ..... 119**

CERÂMICAS AVANÇADAS: PRODUÇÃO DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDOS TERRA RARA-NÍQUEL

Bruna Niccoli Ramirez  
Márcia Tsuyama Escote

**DOI 10.22533/at.ed.21920160111**



**CAPÍTULO 12 ..... 133**

INSERÇÃO DE ESCÂNDIO E FÓSFORO NO SEMICONDUTOR DE DIÓXIDO DE TITÂNIO PARA APLICAÇÃO EM FOTOCATÁLISE

Eduardo Felipe De Carli  
Eliane Kujat Fischer  
Natali Amarante da Cruz  
Alberto Adriano Cavalheiro

**DOI 10.22533/at.ed.21920160112**

**CAPÍTULO 13 ..... 146**

INDUTORES DE RÁDIO FREQUÊNCIA EXTERNOS COM ALTOS FATORES DE QUALIDADE USANDO OURO, SU8 E ALUMINA

Lucas Martins Miranda de Almeida  
Alexandre da Silva Nascimento  
Richard Alexandrino de Macedo  
Angélica dos Anjos Ayala

**DOI 10.22533/at.ed.21920160113**

**CAPÍTULO 14 ..... 153**

INCLUSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  $3Y-ZrO_2$  EM MATRIZ DE  $\alpha-AL_2O_3$  PARA CONFEÇÃO DE INSERTO CERÂMICO

Miguel Adriano Inácio  
José Victor Candido de Souza  
Maria do Carmo de Andrade Nono  
Sergio Luiz Mineiro  
Daniel Alessander Nono

**DOI 10.22533/at.ed.21920160114**

**CAPÍTULO 15 ..... 160**

OPTICAL AND ELECTROCHEMICAL PROPERTIES IN CDSE/CDTE AND CDSE/CDTE NANOCRYSTALS PREPARED BY AQUEOUS SYNTHESIS

Raul Fernando Cuevas Rojas  
Miguel Angel González Balanta  
Silvio José Prado  
Pablo Henrique Menezes  
Lauro Antonio Pradela Filho  
Victor Ciro Solano Reynoso

**DOI 10.22533/at.ed.21920160115**

**CAPÍTULO 16 ..... 170**

PRODUCTION OF ALKALINE PHOSPHATASE BY DENTAL PULP STEM CELLS IN INTERFACE WITH PLASMA MODIFIED TITANIUM

Keylla Dayanne Coelho Marinho de Melo  
Laís Albuquerque Vasconcelos  
Clodomiro Alves Junior  
Jussier Oliveira Vitoriano  
Hugo Alexandre de Oliveira Rocha  
Moacir Fernandes de Queiroz Neto  
José Sandro Pereira da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.21920160116**

**CAPÍTULO 17 ..... 187**

SÍNTESE HIDROTÉRMICA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS DE ALUMINA TRI-HIDRATADA

Ricardo Ritter de Souza Barnasky  
Cristiane Wienke Raubach Ratmann  
Marciel Gaier  
Mário Lúcio Moreira  
Sergio da Silva Cava

**DOI 10.22533/at.ed.21920160117**

**CAPÍTULO 18 ..... 201**

MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA LIGA DE ALUMÍNIO 5052 PARA OBTENÇÃO DE SUPERFÍCIES SUPER-HIDROFÓBICAS

Rafael Gleymir Casanova da Silva  
Maria Isabel Collasius Malta  
Severino Leopoldino Urtiga Filho  
Sara Horácio de Oliveira  
Magda Rosângela Santos Vieira

**DOI 10.22533/at.ed.21920160118**

**CAPÍTULO 19 ..... 207**

INFLUENCE OF THE ALUMINA ADDITION IN THE WEAR RESISTANCE OF THE SINTERED AISI 52100 STEEL

Bruna Horta Bastos Kuffner  
Gilbert Silva  
Carlos Alberto Rodrigues  
Geovani Rodrigues

**DOI 10.22533/at.ed.21920160119**

**CAPÍTULO 20 ..... 212**

IMPROVEMENT OF TITANIUM SURFACE WITH PLASMA NITRIDING TREATMENT

Laís Albuquerque Vasconcelos  
Keylla Dayanne Coelho Marinho de Melo  
Clodomiro Alves Junior  
Jussier Oliveira Vitoriano  
Hugo Alexandre de Oliveira Rocha  
Moacir Fernandes de Queiroz Neto  
José Sandro Pereira da Silva

**DOI 10.22533/at.ed.21920160120**

**CAPÍTULO 21 ..... 226**

AValiação de termofosfatos de alumínio com a adição de escória siderúrgica

Maria Sílvia Camarão de Sousa  
Oscar Jesus Choque Fernandez  
Edilson Carvalho Brasil  
Marcondes Lima da Costa  
Érika Raiol Pinheiro  
Marlo Oliveira Costa

**DOI 10.22533/at.ed.21920160121**

**CAPÍTULO 22 ..... 236**

CARACTERIZAÇÃO DA LAMA DE ALTO-FORNO DE UMA SIDERÚRGICA INTEGRADA DO SUDESTE DO PARÁ

Wellington Bruno Silva de Jesus  
Alacid do Socorro Siqueira Neves  
Emanuel Negrão Macêdo  
José Antônio da Silva Souza  
Luiz Felipe Silva Pereira  
Roseane de Lima Silva  
Verônica Scarpini Cândido  
Antonio Lourenço da Costa Neto  
Raimunda Figueiredo da Silva Maia  
Daniel José Lima de Sousa

**DOI 10.22533/at.ed.21920160122**

**CAPÍTULO 23 ..... 242**

MÉTODO EQUACIONADO PARA PREVISÃO DO TEMPO DE REMOAGEM DE MINÉRIO DE FERRO

Simone Silva Neves  
Filipe Mattos Gonçalves  
Júnia Soares Alexandrino  
Telma Ellen Drumond Ferreira

**DOI 10.22533/at.ed.21920160123**

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 254**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 255**

## PLATAFORMA NANOSTRUTURADA BASEADA EM APTÂMERO PARA DETECÇÃO DE OCRATOXINA A

Data de aceite: 08/01/2020

### Maurilia Palmeira da Costa

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

### Ítala Gabriela Tavares Lima

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

### Ídjane Silva de Oliveira

Centro Acadêmico de Vitoria, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

### Cesar Augusto Souza de Andrade

Departamento de Bioquímica, Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

### Maria Danielly Lima de Oliveira

Departamento de Bioquímica, Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

**RESUMO:** A ocratoxina A (OTA), uma micotoxina produzida principalmente por fungos pertencentes a dois gêneros (*Aspergillus* e *Penicillium*), ocorre em uma ampla variedade

de alimentos e bebidas, incluindo café, cacau, cerveja, vinho, suco de uva e frutas secas. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) classificou a OTA como um possível agente cancerígeno para os seres humanos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sensor baseado em aptâmero, nanotubos de carbono (NTCs) e cisteína para detectar a ocratoxina A. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram utilizadas para caracterizar as etapas de modificação do eletrodo. A interação aptâmero-toxina foi avaliada usando uma solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{4-}$  /  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{3-}$  redox como sonda redox e as alterações nas propriedades interfaciais do eletrodo foram determinadas por VC e EIE. A interação do sensor com diferentes concentrações de ocratoxina, como também avaliação em amostras de café resultou em alterações na resistência à transferência de carga. Em conclusão, o novo aptasensor foi eficiente na detecção de OTA em diferentes concentrações, com um limite de detecção de  $1,0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

**PALAVRAS-CHAVE:** aptasensor; ocratoxina A; nanotubo de carbono; óxido de zinco

### NANOESTRUTURED PLATFORM BASED ON APTAMER FOR DETECTION OF OCHRATOXIN A

**ABSTRACT:** Ochratoxin A (OTA), a mycotoxin

produced mainly by two genera (*Aspergillus* and *Penicillium*), occurs in a wide variety of foods and beverages including coffee, cocoa, beer, wine, grape juice and dried fruits. The International Agency for Cancer Research (IARC) has classified OTA as a possible carcinogen for humans. The objective of this work was to develop an aptamer based sensor, carbon nanotubes (MWCNTs) and cysteine to detect ochratoxin A. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were used to characterize the electrode modification steps. The aptamer-toxin interaction was evaluated using a  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]_{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]_{3-}$  redox solution as the redox probe and changes in electrode interfacial properties were determined by CV and EIS. The interaction of the sensor with different ochratoxin concentrations as well as evaluation in coffee samples resulted in changes in charge transfer resistance. In conclusion, the new aptasensor was efficient at detecting OTA at different concentrations, with a detection limit of  $1.0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

**KEYWORDS:** aptasensor; ochratoxin A; carbon nanotube; zinc oxide.

## 1 | RESUMO

A Ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, representa uma das micotoxinas mais prevalentes na contaminação dos produtos agrícolas, causando riscos à saúde (Nemeab, et al 2017; Al-Anati et al, 2006). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), OTA é classificada no grupo 2B que indica uma possível ação carcinogênica para o ser humano, podendo acarretar efeitos mutagênicos, atividades teratogênicas e imunossupressoras (K'oszegi et al, 2016). A OTA foi detectada em produtos essenciais para o consumo humano: como uva, café, aveia, trigo, milho, arroz, cevada, cacau, entre outros (K'oszegi et al, 2016; Benites et al, 2017; Lee et al, 2015; Cappozzo et al, 2017).

A União Européia estabeleceu uma ingestão semanal tolerável de 120 ng de OTA por kg de peso corporal (Regulamento da Comissão no 594/2012) (Dzuman et al, 2015). A presença de OTA em alimentos como o café tem sido observada em todo o mundo (K'oszegi et al, 2016; Dzuman et al, 2015; Jørgensen et al, 2005). Assim, é importante desenvolver novos métodos de detecção cada vez mais precisos, rápidos e com menor custo, visando reduzir os impactos socioeconômicos em alimentos de distribuição mundial, como o café, que pode acarretar quando sua produção for afetada.

Os aptâmeros são uma excelente alternativa para o desenvolvimento de plataformas de sensores, pois apresentam maior estabilidade em comparação aos anticorpos (O'Sullivan, 2002). A modificação de uma superfície eletroquímica é essencial para a construção de um biossensor. A associação de moléculas e nanoestruturas tem sido comumente usada para imobilização de biomoléculas nos sensores eletroquímicos. Em adição, moléculas de cisteína (Cys) associadas a nanopartículas e nanotubos de carbono são importantes para garantir a eficiência dos

processos de reconhecimento bioquímico.

Dentre os nanomateriais utilizados em biossensores, se destacam os nanotubos de carbono (NTCs). Os NTCs são amplamente utilizados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, pois apresentam alto desempenho analítico devido à sua alta estabilidade química, condutividade elétrica além de rigidez extremamente alta (Asuri et al, 2007). Outro nanomaterial importante é o óxido de zinco (ZnO) que apresenta estabilidade química e um grau significativo de seletividade para substâncias tóxicas (Patel et al, 2016). O ZnO é um tipo de semicondutor (3,37eV) com propriedades elétricas significativas (60 meV) (García-Moraleja et al, 2015).

Os biossensores representam uma tendência futura na detecção de micotoxinas em uma ampla variedade de matrizes alimentares (Puiu et al, 2014), devido ao seu potencial de incorporação em dispositivos portáteis. Para a detecção de OTA, a eletroquímica (Prieto-Simon et al; Heurich et al, 2011; Vidal et al, 2012; Yang et al, 2015; Bonel et al, 2010; Alonso-Lomillo et al, 2010), é considerada uma das técnicas mais apropriadas para aplicações, sendo considerada a mais abundante, apresentando uma elevada sensibilidade de detecção de baixo custo e, principalmente, viabilizando o uso de eletrodos quimicamente modificados (Pereira et al, 2002).

Nossa estratégia para detectar OTA é baseada em voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). O sistema eletroquímico proposto é presta-se para a detecção de OTA em diferentes amostras alimentares sendo de grande auxílio no monitoramento dos níveis de toxinas em produtos agrícolas.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Ferrocianeto de potássio e ferricianeto de potássio K<sub>4</sub> [Fe (CN) 6] / K<sub>3</sub> [Fe (CN) 6] foram obtidos da VETEC (Brasil). 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), CNT de paredes múltiplas, cisteína, aflatoxina B<sub>1</sub>, ocratoxina A (OTA), (3-aminopropil) triethoxysilane (APTES), tolueno anidro, ácido nítrico e hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A Indústria Química Sakai fornece pó ultrafino de ZnO. Os aptâmeros OTA (OTAapt) foram adquiridos da Integrated DNA Technologies (EUA). A sequência do aptâmero foi R-5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA-3'.

### 2.2 Medições eletroquímicas

As análises de EIE e VC foram realizadas em um potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Eco Chemie, Países Baixos). O experimentos de VC foram realizadas a uma velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup> com uma faixa de varredura potencial de -0,2 a 0,7 V. As medidas de EIE foram realizadas na faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz. A amplitude do potencial de onda senoidal aplicada foi de 10

mV em relação ao eletrodo de referência Ag / AgCl.

Os dados eletroquímicos e a simulação dos resultados foram obtidos usando o software NOVA (Autolab, Eco Chemie, Holanda). O eletrodo de ouro modificado foi utilizado como eletrodo de trabalho, fio de platina e Ag/AgCl saturado com KCl foram utilizados como contra eletrodo e referência. As medidas eletroquímicas foram realizadas na solução 10 mM de  $K_4 [Fe(CN)_6]/K_3 [Fe(CN)_6]$  (1:1) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4 ).

### 2.3 Modificação de ZnONPs

O APTES foi utilizado para a modificação do óxido de zinco, como segue: 1, 5 g de óxido de zinco foram dispersos em 50 mL de água destilada com pH ajustado para 6,5 usando solução de  $HNO_3$  2M. A suspensão foi agitada durante 1 h e depois foi adicionado 1 mL de APTES. A solução obtida foi agitada por mais de 24 h, depois o excesso de APTES foi removido por filtração e lavagem com álcool e acetona. Finalmente, o pó foi seco a  $60^\circ C$  sob vácuo (Grasset et al, 2003).

### 2.4 Modificação da superfície do eletrodo de ouro

Inicialmente, o eletrodo de ouro nu (BGE) foi polido com  $0,05 \mu m$  de pasta de alumina ( $\alpha-Al_2O_3$ ), lavado por enxágue e banho ultra-sônico em água ultrapura por 15 min. O processo de modificação do eletrodo modificado Cys\_NTC\_ZnO\_Apt é mostrado na Fig. 1.

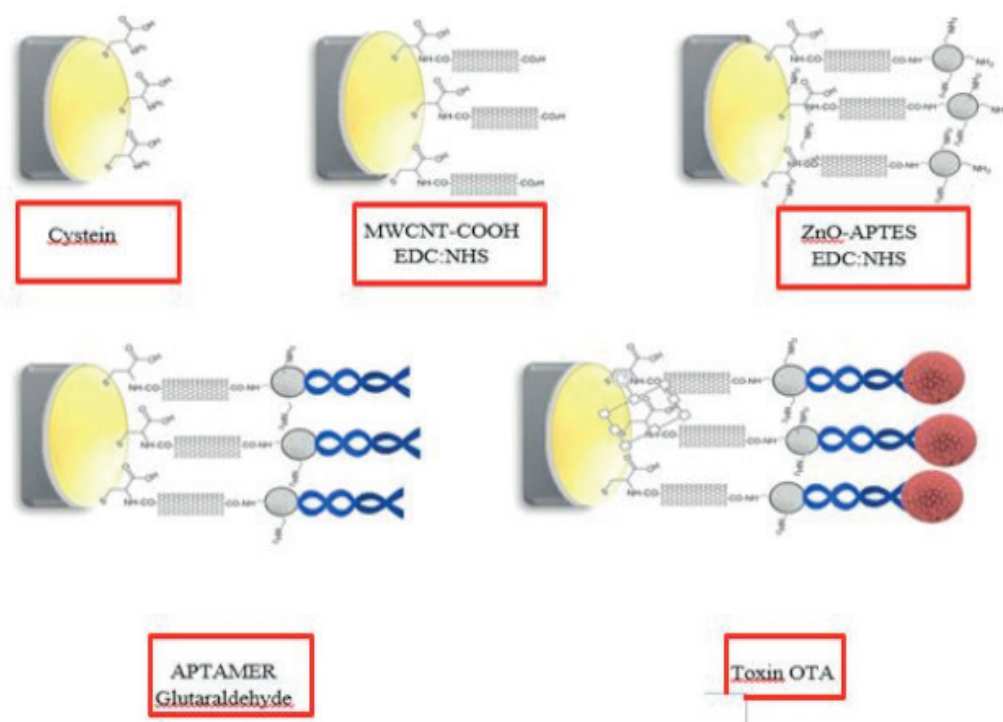


Figura1. Representação esquemática da montagem do biossensor.

Inicialmente foi empregada  $3 \mu L$  de uma solução de Cys a 15 mM sobre o



eletrodo com tempo de incubação de 15 minutos a 25 ° C. Em seguida, 2  $\mu$ L de uma solução aquosa contendo carboxil-NTC foi adsorvida na superfície formando o sistema Cys\_NTC, via ativação por EDC (0,4 M): NHS (0,1 M). Posteriormente, foi adicionado ao sistema, nanopartículas aminadas de ZnO (2  $\mu$ L), as quais foram adsorvidas quimicamente por 20 min para obter o sistema Cys-NTC-ZnONPs. Posteriormente, foi realizada a ativação dos grupos amino para a imobilização do aptâmero. Finalmente, os sítios ativos não específicos foram bloqueados com BSA a 10% p/v. Após esse processo, o aptassensor foi testado em amostras OTA.

## 2.5 Detecção de OTA

A capacidade de biodetecção do eletrodo modificado Cys-CNT-ZnONPs-Apt foi avaliada frente à diferentes concentrações de OTA [1, 25, 50, 75 e 100  $\text{pg mL}^{-1}$ ]. Em adição, o aptasensor foi testado em amostras de café contendo OTA [1, 25, 50, 75 e 100  $\text{pg mL}^{-1}$ ]. OTA foi extraído das amostras de café com processo de metanol (Geremew et al, 2016), seguido de esclarecimento pelo processo de centrifugação. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e evaporado (Haskard et al, 2000).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização eletroquímica

A análise voltamétrica do processo de montagem é mostrada na Fig.2a, observamos que o sinal do eletrodo limpo mostra um voltamograma reversível compatível com a resposta da sonda redox. Foi observada uma diminuição na resposta amperométrica após a modificação do eletrodo para obter o aptasensor. A camada de cys resulta em uma diminuição dos picos anódicos e catódicos. A presença da camada Cys no eletrodo é essencial para o desenvolvimento de sensores nanoestruturados. O sistema Cys-CNTs resulta em picos mais altos de oxidação e redução do par redox com respostas semelhantes ao eletrodo limpo de ouro. A adição de ZnONPs no eletrodo modificado por Cys-CNTs resultou em uma diminuição na resposta amperométrica. Uma redução acentuada nos sinais de picos atuais (Fig. 2a) foi obtida após a imobilização do aptâmero na plataforma nanoestruturada Cys-CNTs-ZnONPs. A extensão da adsorção pode ser expressa pela variação relativa da corrente de pico,  $I$  (%) =  $[(1 / I_b - 1 / I_a)] / (1 / I_b)$  (1), onde  $I_b$  e  $I_a$  correspondem ao pico de corrente anódica antes e após o processo de hibridação, respectivamente.



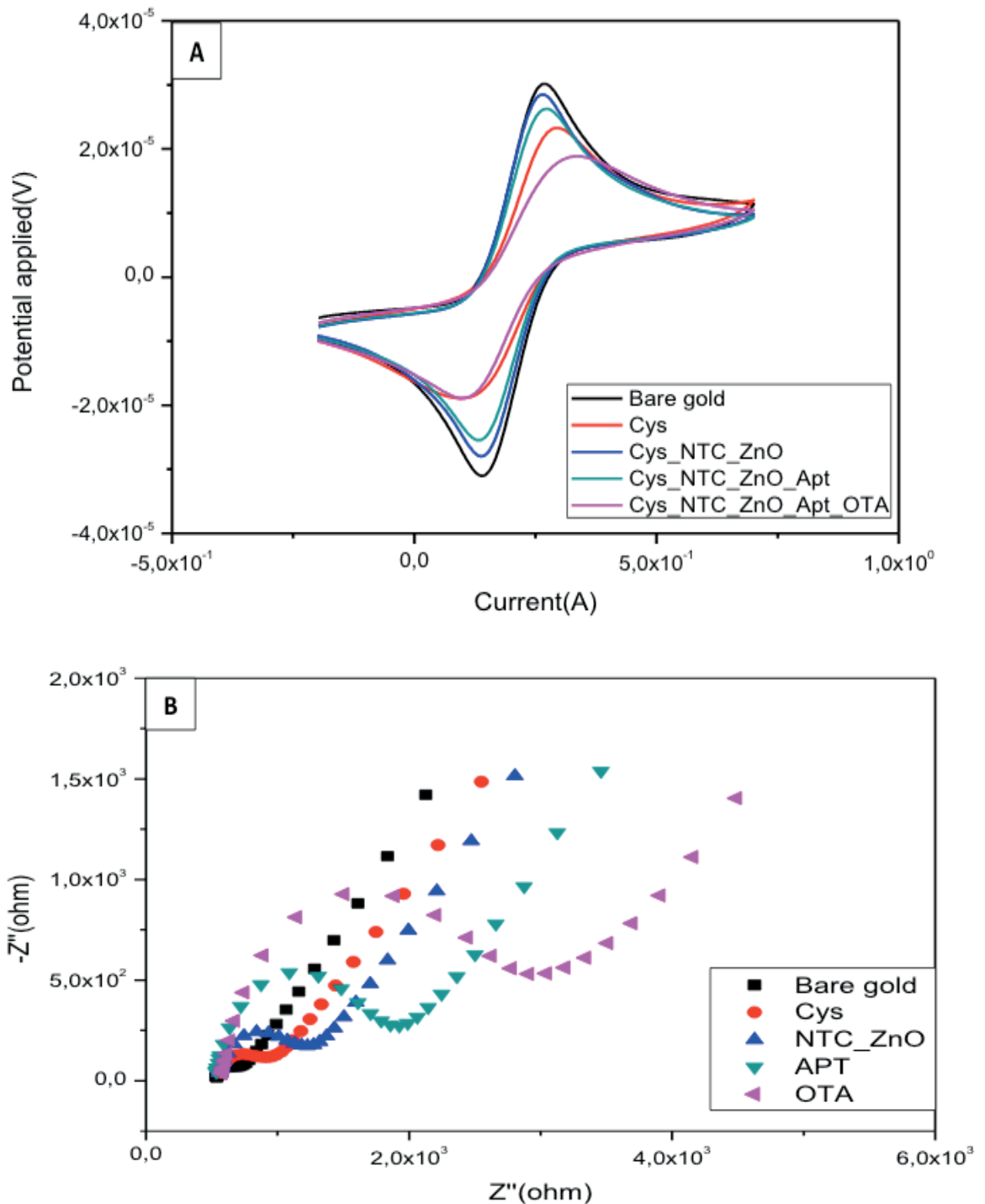


Figura 2. Voltamogramas cíclicos (a) e gráficos de Nyquist (b) para cada etapa na montagem do aptasensor.

No voltamograma cíclico observado na figura 3a, observamos uma redução dos sinais de oxidação / redução do sensor após a exposição a amostras de OTAs, incluindo a separação dos picos do anódicos e catódicos. Apesar do comportamento quase reversível observado, os resultados obtidos sugerem que a diminuição da taxa de transferência de elétrons é proporcional à quantidade de material que reveste a superfície. Após a obtenção do sistema nanoestruturado Cys-NTCs-ZnONPs-Apt, foi observado uma nova redução dos picos anódicos e catódicos do processo de oxidoredução. Um bloqueio adicional da respota eletroquímica foi observada após o contato com amostras de OTAs, diminuindo o fluxo de elétrons.

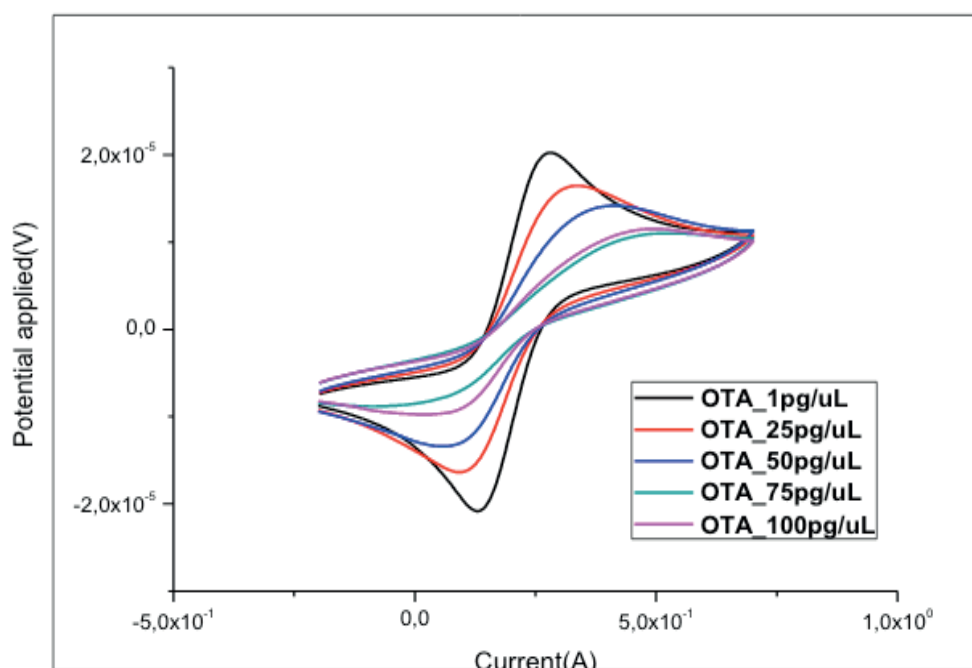


Figura 3. Voltamogramas cíclicos do aptasensor após exposição a diferentes concentrações de OTA (1.0, 25.0, 50.0, 75.0 e 100.0 pg.uL<sup>-1</sup>): (■) 1.0pg.mL<sup>-1</sup>; (■) 25,0 pg.mL<sup>-1</sup>; (■) 50,0 pg.mL<sup>-1</sup>; (■) 75,0 pg.mL<sup>-1</sup>; (■) 100,0 pg.mL<sup>-1</sup>.

Os resultados da variação de corrente de pico para o eletrodo modificado Cys-CNTs-ZnONPs-Apt antes e após a reação com diferentes concentrações de OTA são mostrados na Tabela 1.

| Amostra                     | Antes (I/I <sub>b</sub> μA) | Deteção | ΔI%    |
|-----------------------------|-----------------------------|---------|--------|
| Sistema sensor              | 0,097                       | -       |        |
| OTA 1pg.μL <sup>-1</sup>    | -                           | 0,168   | 71,30  |
| OTA 25 pg.μL <sup>-1</sup>  | -                           | 0,179   | 72,36  |
| OTA 50 pg.μL <sup>-1</sup>  | -                           | 0,182   | 79,99  |
| OTA 75 pg.μL <sup>-1</sup>  | -                           | 0,190   | 89,04  |
| OTA 100 pg.μL <sup>-1</sup> | -                           | 0,197   | 101,05 |

Tabela 1. Deslocamento anódico amperométrico do aptasensor antes e após o bioreconhecimento de ocratoxina A.

Na Tabela 1, observamos que sistema nanoestruturado Cys-NTCs-ZnONPs-Apt, foi capaz de reconhecer a OTA sendo observado um aumento na variação relativa da corrente, resultado de um maior reconhecimento em concentrações mais elevadas de OTA.

A resposta amperométrica total dos sistema é alterada quando os eventos de bioreconhecimento biológico ocorrem. Em adição, a reversibilidade do sistema foi alterada sendo refletido no comportamento semi-reversível observado após a avaliação do sensor frente ao analito teste.

A plataforma desenvolvida composta por nanotubos de carbono permitiu uma

avaliação específica de OTA sem a necessidade de marcador. Nossos resultados de voltametria e de impedância indicam que o aptassensor pode ser aplicado como um método analítico para detecção de OTA em amostras alimentares. O sistema desenvolvido é simples, rápido e de baixo custo e pode ser uma alternativa viável de avaliação de toxinas presnetes em alimentos contaminados.

## REFERÊNCIAS

- Al-Anati, L., Petzinger, E. **Immunotoxic activity of ochratoxin A.** *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29 (2006) 79–90.
- Asuri, P., Bale, S. S., Pangule, R. C., Shad, D. A., Kane, R. C., Dordick, J. S. **Structure, function, and stability of enzymes covalently attached to single-walled carbon nanotubes.** *Langmuir* 23 (2007) 12318-12321.
- B. Prieto-Simon, M. Campas, J.L. Marty, T. Noguier, **Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples, Biosens.** *Bioelectron.* 23 (2008) 995–1002.
- Cappozzo, J., Jackson, L., Lee, H. J., Zhou, W., Al-taher, F., Zweigenbaum, J., RYU, D. **Occurrence of Ochratoxin A in Infant Foods in the United States.** *Journal of Food Protection*, 80 (2017) 251–256.
- Dzuman, Zbynek, et al. **“Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids.”** *Analytica chimica acta*863 (2015): 29-40.
- Jørgensen K. **Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food--a review of EU occurrence data.** *Food Additives & Contaminants*, 22 (2005) 26-30.
- García-Moraleja, G., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E. **Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults.** *Food and Chemical Toxicology*, 86 (2015) 225-233.
- Grasset, F., Saito, N., Li, D., Park, D., Sakaguchi, I., Ohashi, N., Duguet, E. **Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane.** *Journal of Alloys and Compounds*, 360 (2003) 298-311.
- Geremew, T., Abate, D., Landschoot, S., Haesaert, G., Audenaert, K. **Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption.** *Food Control*, 69 (2016) 65-73.
- J. Yang, P. Gao, Y. Liu, R. Li, H. Ma, B. Du, Q. Wei, **Label-free photoelectrochemical immunosensor for sensitive detection of Ochratoxin A, Biosens.** *Bioelectron.* 64 (2015) 13–18.
- Jørgensen K. **Occurrence of ochratoxin A in commodities and processed food--a review of EU occurrence data.** *Food Additives & Contaminants*, 22 (2005) 26-30.
- Lee, H. J., Ryu, D. **Significance of Ochratoxin A in Breakfast Cereals from the United States.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 63 (2015) 9404–9409.
- L. Bonel, J.C. Vidal, P. Duato, J.R. Castillo, **Ochratoxin A nanostructured electrochemical immunosensors based on polyclonal antibodies and gold nanoparticles coupled to the antigen,** *Anal. Method* 2 (2010) 335–34.
- M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, L. Ferreira-Goncalves, M.J. Arcos-Martinez, **Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A, Biosens.** *Bioelectron.* 25 (2010) 1333–1337.

M. Puiu, C. Bala, N. Jaffrezic-Renault, **Progress in biosensor for mycotoxins assay**, Chem. Sensor 4 (2014) 1–10.

M. Heurich, M.K.A. Kadir, I.E. Tothill, **An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis**, Sensor Act. B 156 (2011) 162–168.

Nemeab, K., Mohammed, A. **Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as mitigation strategies**. Food Control, 78 (2017), 412-425.

O'Sullivan, C.K. **Aptasensors – the future of biosensing?** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372 (2002) 44–48.

Pereira, A. C.; Santos, A. D. S. and Kubota, L. T.; **Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas**. Química Nova, 25 (2002), 1012-1021.

Villamizar-gallardo, R., Cruz, J.F.O., Ortiz-Rodriguez, O.O. **Efeito fungicida de nanopartículas de prata em fungos toxigênicos em cacauero**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 51, n. 12, p. 1929-1936,

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**Henrique Ajuz Holzmann:** Professor da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Graduação em Tecnologia em Fabricação Mecânica e Engenharia Mecânica pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Mestre em Engenharia de Produção pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Doutorando em Engenharia e Ciência dos Materiais pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Trabalha com os temas: Revestimentos resistentes a corrosão, Soldagem e Caracterização de revestimentos soldados.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Alumina-zircônia 154, 156

Aptasensor 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 87, 88, 91, 92, 93

Área específica 108, 115, 116, 117, 142, 143

### B

Biogás 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35

Biomateriais 74, 75, 209

### C

CdTe/CdSe 161, 162, 163, 164, 165, 168, 169, 170

Compósito 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Conversão 108, 110, 112, 115, 116, 118

### E

Eletrofiação 73, 74, 75, 77, 79, 80, 81, 83, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 131

Eletroquímica 52, 53, 55, 57, 60, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 87, 88, 89, 91, 92, 189

Engenharia tecidual 74

Espaçamento de fibra 1

### F

Fase Anatase 133, 135, 136, 140, 141, 142, 143

Fator de Qualidade 146, 147, 151, 152

Fibra de Juta 10, 12, 22

Fibra de vidro 10, 12, 13, 20, 21

Fibras de carbono 36, 37, 38, 40, 49

Fibras de sisal 1, 2, 3, 7, 14

Fibras naturais 1, 2, 10, 11, 12, 13, 21

Filtro 23, 28, 33, 97

Fosfato metálico 133

Fotocatálise 133, 134, 135, 142, 144

### G

Gelatina 108, 110, 111

Genossensores 64, 65, 66

### H

H<sub>2</sub>S 23, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 34

Híbrido 10, 13, 21

## I

Indutores Internos 146, 151

## L

Laminados 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21

LaNiO<sub>3</sub> 119, 120, 121, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131

## M

Meniscos 73, 74, 75, 80, 81, 83

Microdomínios 36, 38, 40, 44, 45, 46, 47, 48, 49

## N

Nanocompósito 96, 99, 101, 104, 105

Nanocristais 162

Nanopartículas de Ouro 63, 66, 68

Nanotubo de carbono 51, 87

Neuroesquistossomose 63, 64, 65, 70, 71, 72

Núcleo/casca 162

## O

Ocratoxina A 51, 52, 87, 88

Óxido de zinco 51, 52, 54, 87, 89, 90, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 106, 205, 206

## P

Pechini 23, 24, 27, 34, 108, 109, 110, 111, 118

Perovskita 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 116, 117, 120

Piche mesofásico 36, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49

Poli(ácido láctico) 96, 97

Propriedades mecânicas 1, 2, 5, 10, 12, 13, 21, 36, 37, 38, 49, 75, 83, 97, 98, 104, 106, 154, 155, 156, 158, 159, 209

## R

Rádio Frequência 146, 147

## S

Síntese coloidal 162

Sol-Gel 122, 132, 133, 134, 136, 144

## T

Teoria mesoscópica do contínuo 36, 39

## U

Umidade 12, 14, 23, 24, 25, 27, 28, 31, 32, 33, 52, 77, 97, 123, 137, 230, 239, 240, 241

