

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA



GILCELIA JANAINA LINO DA SILVA

Desenvolvimento de um sensor impedimétrico para detecção  
de *Penicillium sclerotigenum* baseado no composto  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -  
hidrocloreto de poli(alilamina)

Recife  
2013

GILCELIA JANAINA LINO DA SILVA

Desenvolvimento de um sensor impedimétrico para detecção de *Penicillium sclerotigenum* baseado no composto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-hidrocloreto de poli(alilamina)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. César Augusto Souza de Andrade

Co-orientadora: Profa. Maria Danielly Lima de Oliveira

Recife

2013

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

S586d Silva, Gilcelia Janaina Lino da

Desenvolvimento de um sensor impedimétrico para detecção de *Penicillium sclerotigenum* baseado no compósito Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-hidroclorato de poli(alilamina) / Gilcelia Janaina Lino da Silva. – Recife: O Autor, 2013.

115 f: il., fig., tab.

Orientadora: César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui bibliografia

1. Fungos fitopatogênicos 2. *Penicillium* 3. Inhame I. Andrade, César Augusto Souza de (orientador) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorientadora) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-125

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Lino, Gilcelia

Título: Desenvolvimento de um sensor impedimétrico para detecção de *Penicillium sclerotigenum* baseado no compósito Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-hidrocloreto de poli(alilamina)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 21/10/2013

### Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Departamento de Biofísica - Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira

Centro Acadêmico de Vitória - Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, a minha mãe Maria, minha irmã Gilvanete, meu noivo Fred, por todo amor, carinho, por estarem sempre me apoiando e me dando forças.

## AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir que eu conclua mais essa jornada na minha vida, por me proteger e sempre iluminar os meus caminhos;
- A minha mãe, Maria por sempre me apoiar, e me dar força quando necessário, por seu amor, carinho, dedicação e sacrifícios;
- A minha irmã, Gilvanete, por seu amor, carinho, companheirismo;
- Ao meu noivo, Frederico, por seu carinho, amor, dedicação. Por me ajudar nos estudos para seleção do mestrado, por sempre me apoiar e permitir que eu nunca desista;
- A minha sogra, meu sogro e minha cunhada por todo carinho, amor, por sempre acreditarem e torcerem por mim;
- A todos os meus familiares que sempre torceram por mim;
- Aos meus orientadores Maria Danielly e César Augusto, agradeço todos os ensinamentos, a dedicação, confiança e amizade;
- A todos que fazem parte do grupo de Polímeros Não-Convencionais e em especial ao prof. Celso Pinto de Melo por permitir a utilização do laboratório para o desenvolvimento deste trabalho;
- Aos meus amigos do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Jéssica, Jordana, Débora, Elton, Karen pelas sugestões, por me ajudarem com minhas dúvidas e pela amizade.
- A prof<sup>a</sup> Suely Galdino (*in memoriam*), por seus ensinamentos, pela amizade e por mostrar que a pesquisa e as necessidades da sociedade devem andar sempre juntas e que é de extrema importância voltar o olhar para população. Meu eterno respeito e gratidão;
- A Tarcyla pela realização das imagens de AFM de grande importância no meu trabalho;
- A Paulo Germano por ser bastante prestativo;
- A Capes pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

## RESUMO

Da SILVA, GILCELIA JANAINA LINO. Desenvolvimento de um sensor impedimétrico para detecção de *Penicillium sclerotigenum* baseado no compósito Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-hidroclorato de poli(alilamina). 2013. 115f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Neste trabalho foi descrito um novo biossensor de DNA para detecção de *Penicillium sclerotigenum* toxigênico aplicado a culturas puras e inime infectado. A detecção do *Penicillium sclerotigenum* toxigênico é realizada por meio de uma monocamada automontada do compósito (magnetita/hidroclorato de poli(alilamina) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA) que serve como uma camada de ancoragem para do DNA. A espectroscopia de impedância elétrica (EIE) foi utilizada para avaliar e quantificar o grau de . O compósito é uma boa plataforma para imobilização de biomoléculas, devido a presença de vários sítios de ligação para nucleotídeos, aumento da área superficial e boa biocompatibilidade. O biossensor foi capaz de não somente detectar qualitativamente a presença do genoma do fungo em baixas concentrações, mas também um aumento da resposta impedimétrica quando a resistência elétrica foi monitorada ao longo do tempo de exposição, demonstrando que o sistema pode avaliar quantitativamente o genoma do fungo. O biossensor Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-primer requer apenas pequenos volumes e baixas concentrações do analito quando utilizado na detecção da contaminação de *Penicillium sclerotigenum* em alimentos. Portanto, o biossensor obtido apresenta elevada seletividade, especificidade e reprodutibilidade.

Palavras-chave: Espectroscopia de impedância; *Penicillium sclerotigenum*; Nanopartículas magnéticas; Compósito; Biossensor.

## ABSTRACT

Da SILVA, GILCELIA JANAINA LINO. Development of impedimetric sensor for *Penicillium sclerotigenum* detection based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-poly(allylamine hydrochloride) composite. 2013. 115f. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

In this work we describe a new DNA biosensor for the detection of toxigenic *Penicillium sclerotigenum* applied to pure culture or infected yams. The *P. sclerotigenum* detection takes place on a self-assembled monolayer of a (magnetite)/(poly(allylamine hydrochloride)) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH) composite that serves as an anchoring layer for the DNA hybridization interaction. Electrical impedance spectroscopy (EIS) was used to evaluate and quantify the hybridization degree. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH composite is a good platform for the immobilization of biomolecules, due to the presence of many possible binding sites for nucleotides and to its large surface-to-volume ratio and good biocompatibility. The biosensor was capable qualitatively detecting the presence of the fungus genome at low concentrations, but also an increased impedimetric response when the electrical resistance was monitored along the time of exposure, showing that the system can quantitatively evaluate the fungus genome. A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH-probe biosensor would require only small volumes and low concentrations of the analyte when used, for instance, in detecting *P. sclerotigenum* contamination of food. Therefore, the obtained biosensor demonstrates high selectivity, specificity and reproducibility.

Keywords: Impedance spectroscopy; *Penicillium sclerotigenum*; Magnetic nanoparticles; Composite; Biosensor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Inhame da espécie <i>Dioscorea alata</i> com a doença podridão-verde.....	20
Figura 2 -	<i>Penicillium sclerotigenum</i> .....	23
Figura 3 -	Estrutura química da patulina.....	27
Figura 4 -	Esquema da biossíntese da patulina.....	29
Figura 5 -	Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.....	36
Figura 6 -	Representação dos métodos de imobilização de biomoléculas (círculo vermelho com letra B).....	40
Figura 7 -	Estrutura monomérica do HPA.....	45
Figura 8 -	Modelo de circuito equivalente utilizado em espectroscopia de impedância.....	47
Figura 9 -	Modelo do circuito de Randles.....	48
Figura 10 -	Representação da semelhança entre um capacitor de um circuito elétrico (modelo Helmholtz) com a interface eletrodo/solução de uma célula elétrica.....	49
Figura 11 -	Diagramas de Nyquist (a) e Bode (b).....	50
Figura 12 -	Representação do princípio de funcionamento do AFM.....	52
Figura 13 -	Curva de força em função da distância entre a sonda e a amostra.....	54
Figura 14 -	Esquema do processo de fabricação do biossensor...	59
Figura 15 -	Diagrama de Nyquist antes e após a adição de HPA na superfície do eletrodo de ouro em diferentes tempos (a) e $R_e$ x tempo de exposição de HPA (b).....	62
Figura 16 -	Diagrama de Nyquist da variação da concentração de $Fe_3O_4$ -HPA (a) e $R_e$ vs. Concentração $Fe_3O_4$ (b).....	63
Figura 17 -	Diagrama de Nyquist do eletrodo modificado com $Fe_3O_4$ -HPA após a imobilização do primer em diferentes tempos (a) e $R_e$ vs. tempo de exposição do $Fe_3O_4$ -HPA-primer (b).....	64
Figura 18 -	Diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode (b) do processo de montagem do biossensor.....	67
Figura 19 -	Circuito equivalente adotado para o ajuste dos dados de impedância.....	68
Figura 20 -	Diagrama de Nyquist da variação da concentração do <i>P. sclerotigenum</i> .....	70

Figura 21 - $\Delta R_e\%$ vs. Diferentes concentrações do genoma do <i>P. sclerotigenum</i> .....	71
Figura 22 - Diagrama de Nyquist das soluções obtidas de inhame contaminado com <i>P. sclerotigenum</i> em diferentes concentrações.....	72
Figura 23 - $\Delta R_e\%$ do sistema $Fe_3O_4$ -HPA-primer após o processo de hibridação com inhame contaminado com <i>P. sclerotigenum</i> em diferentes concentrações.....	72
Figura 24 - Imagens topográficas da superfície do eletrodo modificado com HPA (a), $HPA-Fe_3O_4$ (b) e $HPA-Fe_3O_4$ -primer-genoma complementar (c).....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação seccional de <i>Penicillium</i> subg. <i>Penicillium</i> .....	22
Tabela 2 -	Classificação taxonômica do <i>P. sclerotigenum</i> .....	25
Tabela 3 -	Limites máximos permitidos de patulina em diversos países.....	31
Tabela 4 -	Valores dos elementos do circuito equivalente do ajuste dos resultados de impedância e da variação relativa dos dados de impedância para a passagem de corrente elétrica.....	69

## LISTA DE SIGLAS

6MSA	Ácido 6-metilsalicílico
AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i> )
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPP	Contagem-padrão em placas
Cr-Au	Cromo-ouro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIE	Espectroscopia de impedância elétrica
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
FDA	Administração de Alimentos e Drogas (do inglês <i>Food and Drug Administration</i> )
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA	Compósito de óxido de ferro-hidroclorato de poli(alilamina)
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto férrico hexahidratado
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (do inglês <i>Fluorescence in situ Hybridisation</i> )
HPA	Hidroclorato de poli(alilamina)
IBM	<i>International Business Machines</i>
IDH	Isoepoxidon desidrogenase
KHz	Quilohertz
Mtx	Micotoxinas
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amônio
NPs	Nanopátículas
NpsFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Nanopartículas de óxido de ferro
<i>P. sclerotigenum</i>	<i>Penicillium sclerotigenum</i>
p/v	Peso/volume
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polimerase</i>

*Chain Reaction)*

pH	Potencial hidrogeniônico
PIM	Polímeros de impressão molecular
ppb	Partes por bilhão
Ptn	Patulina
RNA	Ácido ribonucléico
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\Omega$	Ohm
$\phi$	Diâmetro
$\omega$	Frequência
$\varphi$	Ângulo de fase
$ Z $	Módulo de impedância
$C_{dl}$	Capacitância de dupla camada elétrica
$F$	Força de atração
$F_0$	Constante de Mola
$k$	Constante elástica
$R_e$	Resistência à passagem de corrente elétrica
$R_s$	Resistência da solução
$W$	Impedância de Warburg
$Z_f$	Impedância faradáica
$Z_{im}$	Impedância imaginária
$Z_{re}$	Impedância real
$\Delta R_e$	Varição da resistência á passagem de corrente elétrica

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	i
	<b>ABSTRACT</b>	ii
	<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	iii
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	v
	<b>LISTA DE SIGLAS</b>	vi
	<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	viii
	<b>SUMÁRIO</b>	ix
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	Inhame.....	18
2.2	<i>Penicillium</i> .....	21
2.3	<i>Penicillium sclerotigenum</i> .....	23
2.4	Micotoxinas.....	26
2.4.1	Patulina.....	27
2.4.1.1	Síntese da patulina.....	28
2.4.1.2	Toxicologia.....	29
2.4.1.3	Regulamentação para patulina.....	30
2.5	Métodos de identificação e detecção de fungos toxigênicos em alimentos.....	32
2.6	Biossensores.....	35
2.6.1	Classificação dos sistemas de transdução.....	36
2.6.2	Classificação dos Biossensores.....	39
2.6.3	Técnicas para imobilização de biomoléculas.....	40
2.6.1	Aplicações dos Biossensores.....	42
2.7	Compósitos.....	44
2.8	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	46
2.9	Microscopia de Força Atômica.....	51
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	55
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	56
4.1	Objetivo Geral.....	56
4.2	Objetivos Específicos .....	56
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	57
5.1	Materiais.....	57
5.2	Extração do DNA do <i>Penicillium sclerotigenum</i> e do inhame com Podridão-verde.....	57
5.3	Preparação das Nanopartículas Magnéticas.....	58
5.4	Preparação da matriz Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> e do sistema biossensível..	58

5.5	Medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica.....	60
5.6	Simulação do circuito equivalente das análises de impedância elétricas.....	60
5.7	Medidas de Microscopia de Força Atômica.....	60
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	61
6.1	Análises de EIE.....	61
6.2	Análises Morfológicas.....	73
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	75
8	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	76
8	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
9	<b>APÊNDICE</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações nas propriedades nutricionais e sensoriais de alimentos contaminados por fungos representam um grande problema para indústria de alimentos e saúde pública, especialmente para fungos toxigênicos com potencial carcinogênico (SENEVAJSOVA et al., 2010). O *Penicillium sclerotigenum* é um fungo fitopatogênico e toxigênico, causador da doença podridão-verde em inhame, sendo responsável por grandes perdas na agricultura, além de ser capaz de produzir a patulina (Ptn) (FRISVAD E SAMSON, 2004; OLIVEIRA et al., 2007). A patulina é uma micotoxina (Mtx) mutagênica, imunotóxica e genotóxica.

Atualmente, a detecção de fungos em alimentos é realizada por meio da contagem-padrão em placas (CPP) de bolores e leveduras e a detecção de micotoxinas ocorre por meio de técnicas, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entretanto, o CPP demanda tempo necessário ao crescimento da cultura, técnicos especializados, apresentam baixa especificidade, precisão e reprodutibilidade. Os métodos de CCD e CLAE exigem extrema limpeza dos extratos alimentares para análise, reagentes com alto grau de pureza e muitas vezes tóxicos, grande quantidade de reagentes, alto custo de instrumentação/manutenção e supervisão de técnicos especializados, impossibilitando uma análise rápida e eficaz das amostras contaminadas por micotoxinas. Consequentemente é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos produtos tecnológicos voltados para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos que superem as limitações das técnicas existentes.

Um biossensor impedimétrico possui os requisitos necessários para o desenvolvimento de um novo método de detecção de cepas toxigênicas de *P. sclerotigenum* devido às suas características de elevada sensibilidade. Em geral os biossensores impedimétricos são confiáveis, rápidos, sensíveis, simples e com possibilidade de superação das limitações das técnicas atuais. Para construção de sistemas biossensíveis é importante a utilização de

materiais que melhorem a resposta física (elétrica, óptica ou piezoelétrica) e apresentem excelente biocompatibilidade. Em adição, nanoestruturas híbridas formadas pela associação de nanopartículas magnéticas e hidrocloreto de poli(alilamina) (HPA) podem ser utilizadas com esta finalidade. Desta forma, partículas magnéticas, como por exemplo, nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e o HPA foram utilizados como alvo de estudo para a imobilização de biomoléculas devido às suas propriedades, como, biocompatibilidade, vários sítios de ligação para nucleotídeos, aumento da área superficial, os quais são elementos essenciais para o desenvolvimento de genossensores (sistemas biossensíveis associados ao uso de oligonucleotídeos).

Desta forma, neste trabalho desenvolveu-se um biossensor nanoestruturado para avaliar-se a interação de material genético de *P. sclerotigenum* em superfícies modificadas de HPA-NPsFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. E, posteriormente, avaliar a detecção do *P. sclerotigenum* em culturas puras e de inhame contaminado (podridão-verde) por meio de técnicas elétricas. O genossensor desenvolvido neste trabalho apresentou uma alta sensibilidade, utilização de pequenos volumes (2µL) e baixas concentrações (pg/µL). Além disso, pode-se destacar a seletividade e rapidez do teste, representando uma excelente ferramenta para detecção de fungos quando comparado aos métodos atuais utilizados na rotina da indústria alimentícia.

Este trabalho está estruturado em nove tópicos e um apêndice, como seguem:

No primeiro tópico foi apresentada a introdução sobre o trabalho, destacando a importância do controle de qualidade de alimentos e a necessidade do desenvolvimento de novos dispositivos de detecção de fungos e toxinas em alimentos. O segundo refere-se à revisão da literatura sobre inhame, o gênero *Penicillium*, a espécie *Penicillium sclerotigenum*, micotoxinas, a micotoxina patulina, métodos de detecção e identificação de fungos, biossensores, compósitos, espectroscopia de impedância elétrica e microscopia atômica. No terceiro é apresentada a justificativa para o

desenvolvimento do trabalho. Em seguida são descritos os objetivos gerais e específicos da dissertação e é apresentada a metodologia utilizada para o desenvolvimento da pesquisa. Posteriormente, os resultados e as respectivas discussões são descritos, seguidos das conclusões e as perspectivas futuras deste estudo. E, finalmente as referências bibliográficas utilizadas no desenvolvimento deste documento. No apêndice consta a carta de aceite e a versão do artigo aceite para publicação na revista *Journal of Colloid & Interface Science*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Inhame

O nome inhame surgiu a partir das palavras "*niam*" do dialeto Mande ou de "*en yame*" do Temme, sendo esses termos adaptados para o português e então derivado a palavra inhame (ADESUYI, 1997).

O inhame (*Dioscorea* spp.) é uma monocotiledônia pertencente à família *Dioscoreaceae*, cujo órgão de reserva é conhecido como túbera, que pode ser utilizada para o plantio (semente) ou consumo, sendo o principal componente de armazenamento o polissacarídeo, amido. O cultivo tipo túbera ocorre principalmente na Ásia, África, México, Caribe e América do Sul, onde o Brasil é o maior produtor, sendo a sua produção centralizada na região nordeste (~90%) com os principais campos de cultivo localizados na Paraíba e Pernambuco, primeiro e segundo maiores produtores do país, respectivamente (SANTOS, 1996; OLIVEIRA, 2005).

O cultivo do inhame ocorre em periferias de florestas úmidas, em solos de textura arenosa, suficientemente profundo bem drenados e arejados, férteis, ricos em matéria orgânica, com pH entre 5,5 a 6,0 (SANTOS, 1996). O ciclo do inhame é anual e sendo produzidos dois tipos de túberas, como seguem: i) as comerciais, que são colhidas após cinco a seis meses de plantio; e, ii) as sementes, que são colhidas três meses após as túberas comerciais (SILVA, 1965), também conhecidas pelos agricultores do nordeste como *mamas*. Esse produto agrícola possui um apreciável valor comercial no mercado interno e externo, representando um alimento rico em carboidratos, especialmente amido, sais minerais e vitaminas do complexo B (SILVA, 1965).

No Brasil há duas espécies de inhame, a *Dioscorea cayennensis* e a *Dioscorea alata*, as quais são as mais comercializadas para alimentação humana. A *Dioscorea cayennensis* possui apenas uma única variedade que é conhecida como inhame da costa, sendo a preferida para o consumo no

Nordeste do país e praticamente a única nos programas de exportação. A maior parte da produção deste inhame é destinada ao comércio interno e a outra parte, de melhor qualidade, para a exportação, sendo os Estados Unidos, Reino Unido, Países Baixos, Canadá e França os principais compradores (MESQUITA, 2002).

O Inhame São Tomé e Nambu são as duas variedades da espécie *Dioscorea alata* mais difundidas na região nordeste e bem aceitas como alimento. Entretanto, por serem altamente suscetíveis à doença requeima das folhas, de alta severidade e etiologia ainda desconhecida, são pouco cultivadas na Paraíba e em Pernambuco.

Na industrialização a farinha de inhame da costa pode ser aproveitada no preparo de farinhas mistas panificáveis, numa proporção de até 50% de mistura com farinha de trigo, sem que ocorram alterações das propriedades organolépticas e de panificação (CÂMARA FILHO *et al*, 1967).

A cadeia produtiva do inhame ainda representa uma atividade agrícola familiar, promovendo a geração de renda e empregos numa faixa de aproximadamente 1,25 homem/hectare/ano (SANTOS, 2002). Além disso, envolve outros setores como o armazenamento, transporte e comercialização, representando um produto de grande importância econômica e social para o desenvolvimento da região (OLIVEIRA, 2007).

Entretanto, o cultivo e comercialização do inhame têm sido afetados por um grande problema fitossanitário denominada de podridão-verde (Fig. 1), que restringe o comércio exportador do inhame da costa. Esta é uma doença fúngica, de alta severidade, causada pelo *Penicillium sclerotigenum* e que promove deterioração das túberas durante o armazenamento e transporte (OLIVEIRA, 2007).

Essa doença foi descrita no Brasil por Moura *et al.* em 1976 em Pernambuco, quando na ocasião foi criada a denominação podridão-verde. A podridão-verde é um problema de pós-colheita, resultando em grandes perdas durante o transporte e armazenamento das túberas comerciais e

sementes. As perdas causadas são permanentes e a doença ocorre sempre em altos índices de incidência e severidade, principalmente em épocas chuvosas, devido à grande umidade existente nos armazéns. Perdas também ocorrem nos porões de navios, causadas pelas longas travessias durante o processo de exportação (MOURA, 2005).



Figura 1 – Inhame da espécie *Dioscorea alata* com a doença podridão-verde.

Fonte: Oliveira, 2006.

De modo geral o desenvolvimento da doença inicia-se com a penetração do fungo através de ferimentos presentes no inhame, produzidos durante a colheita e/ou limpeza das túberas e também como resultado do parasitismo por vermes, os fitonematóides. O primeiro sintoma perceptivo é uma pequena mancha úmida, originando uma lesão profunda, de coloração marrom, sobre a qual se observa uma camada de micélio, de cor verde acinzentado, formada por conidióforos que é uma estrutura microscópica responsável por produzir esporos assexuais, os conídios do fungo. Posteriormente, tem início a saprogênese, onde o *P. sclerotigenum* produz

grande quantidade de estrutura de resistência denominadas de esclerócios, dentro dos tecidos colonizados, uma das principais características da espécie (SANTOS, 1996). A doença torna a túbera comercial imprópria para consumo e nas sementes a brotação é comprometida, ocasionando falhas no plantio (MOURA *et al.*, 1976). O fungo dissemina-se facilmente de um túbera para outra durante o armazenamento e/ou através do contato direto. Os ferimentos que são causados durante os processos de colheita, transporte e embalagem ou por contaminação prévia por fitonematóides predis põem o inhame sadio a contrair a doença através do contato com os inhames contaminados. Fatores como condições de armazenamento, altas temperaturas, umidade, pouca ventilação e baixa umidade favorecem o desenvolvimento da doença. Além disso, áreas de armazenamento infestadas são focos de disseminação do fungo (ALVES, 2002).

Vale a pena destacar que outras espécies de *Penicillium* podem causar podridão-verde, mas no Brasil até o momento há a ocorrência apenas do *Penicillium sclerotigenum* (Oliveira, 2007).

## 2.2 *Penicillium*

O gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez em 1809 por Link. Este gênero pertence à família *Trichocomaceae* e se caracteriza por produzir conídios em cadeias em uma estrutura ramificadas chamadas de fiálides, com os conidióforos apresentado morfologia semelhante a um pincel (Fig. 2). O gênero *Penicillium* esta subdividido em subgêneros conforme a morfologia do conidióforo e a velocidade de crescimento, os quais são *Aspergilloides* (monoverticulados), *Biverticillium* (biverticulados), *Furcatum* (biverticulados e o *Penicillium* (triverticulados) (FRISVAD e SAMSON, 2004).

Atualmente no subgênero *Penicillium* são aceitas 58 espécies, formando seis seções fenotipicamente distintas e 17 séries (FRISVAD e SAMSON, 2004) (Tabela 1). Essa classificação foi proposta por FRISVAD e SAMSON (2004) é a atualmente a mais aceita. Esta proposta leva em

consideração as características micro e macro-morfológicas, fisiológicas, nutricionais, análise de metabólitos secundários e micotoxinas. À análise de todos esses parâmetros importante na identificação e confirmação das espécies.

Tabela 1. Classificação seccional de *Penicillium* subg. *Penicillium*.

SEÇÃO	SÉRIE
<i>Coronata</i>	<i>Olsonii</i>
<i>Roqueforti</i>	<i>Roqueforti</i>
<i>Chrysogena</i>	<i>Chrysogena</i> <i>Mononematosa</i> <i>Aethiopica</i> <i>Persicina</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Expansa</i> <i>Urticicolae</i> <i>Claviformia</i> <i>Itálica</i> <i>Gladioli</i>
<i>Digitata</i>	<i>Digitata</i>
<i>Viridicata</i>	<i>Viridicata</i> <i>Corymbifera</i> <i>Verrucosa</i> <i>Camemberti</i> <i>Solita</i>

Fonte: Adaptada de Frisvad e Samson, 2004.

As espécies do gênero *Penicillium* possuem ampla distribuição na natureza e se desenvolvem nos mais diversos substratos. Esses micro-organismos sintetizam vários metabólitos secundários, tais como antibióticos, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, enzimas, fungicidas e micotoxinas. Desta forma, as espécies do gênero *Penicillium* são uma fonte potencial de estudo como, por exemplo, o *P. sclerotigenum* que é um fungo toxigênico, capaz de sintetizar dentre vários metabólitos secundários uma micotoxina altamente tóxica, a patulina.

Em adição, a contaminação do inhame pode ocorrer por várias espécies de *Penicillium* que causam podridão-verde, como por exemplo, *P. chrysogenum*, *P. oxalicum*, *P. italicum* e *P. expansum* (OKIGBO, 2004).

### 2.3 *Penicillium sclerotigenum*

*P. sclerotigenum* (Fig. 2) foi descrito pela primeira vez no Japão por Yamamoto *et al.* em 1955 (YAMAMOTO *et al.* 1955), sendo descrito morfológicamente em Pernambuco, Brasil no ano de 1976 por Moura *et al.* A primeira citação desse fungo em manuais para identificação de espécies de *Penicillium* aconteceu em 1979.

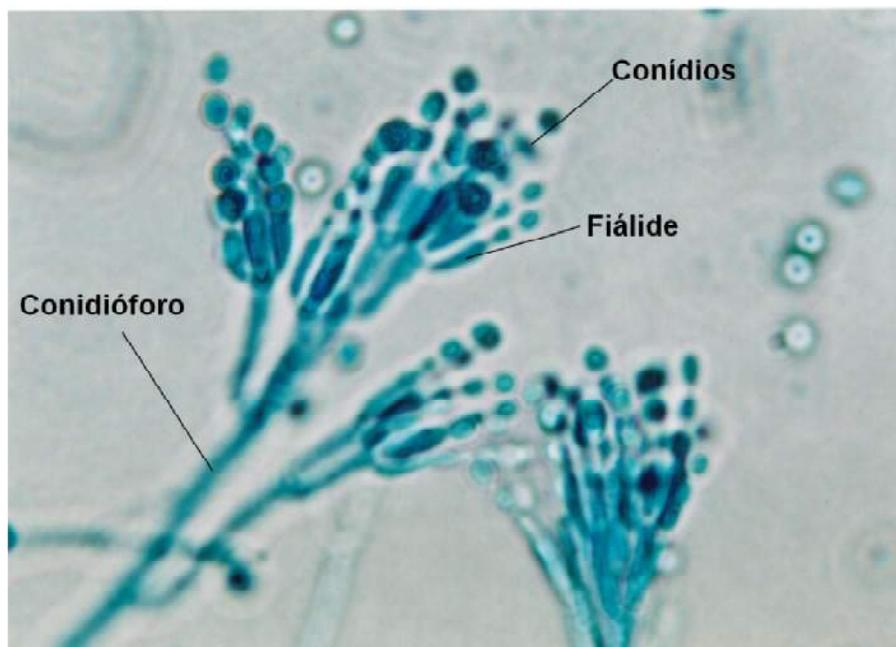


Figura 2 – *Penicillium sclerotigenum*. Fonte: Oliveira, 2006.

A descrição mais completa do fungo foi publicada em 2004 por Frisvad e Samson (Tabela 2). Esse estudo além de fornecer dados morfológicos, apresentou outras informações importantes sobre o *P. sclerotigenum*, tais como produção e identificação de metabólitos secundários e sequenciamento do gene da  $\beta$ -tubulina. Esse gene codifica a proteína  $\beta$ -tubulina que é

responsável pela formação do citoesqueleto e apresenta participação em vários processos celulares como a motilidade celular, transporte citoplasmático e divisão celular. A sequência de nucleotídeos desse gene é importante na diferenciação entre espécies e subgrupos dentro de uma mesma espécie (BANKE *et al*, 2004).

As culturas puras do fungo mostram colônias de crescimento rápido, com micélio denso, verde acinzentado e depois cinéreo-oliváceo, com área sub-marginal com ou sem exsudatos transparentes, produzindo abundantes esclerócios globosos e marrons; difundindo pigmento no meio; conidióforos frouxos oriundos do micélio aéreo, septados, formando pincéis bi ou triverticilados; cada verticílio com 2 a 5 metulas e em cada metula, fiálides com conídios em cadeia, elipsóides e pálidos (MOURA *et al.*; 1976).

Conforme apresentado anteriormente, o *P. sclerotigenum* é responsável por causar uma doença fúngica de grande importância econômica em inhames, a podridão-verde. Essa espécie de *Penicillium* é capaz de produzir diversos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Em seus estudos Clarke e Mckenzie (1967) identificaram a produção de griseofulvina em extratos de micélio de isolados desse fungo. Em adição, a griseofulvina é uma substância antifúngica que apresenta ação fungistática através da atuação no sistema microtubular dos fungos, entretanto hoje em dia é considerada uma substância tóxica ao homem e não é mais utilizada.

Tabela 2- Classificação taxonômica do *P. sclerotigenum*.

Classificação taxonômica	
Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Subfilo	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Subclasse	<i>Eurotiomycetidae</i>
Ordem	<i>Eurotiales</i>
Família	<i>Trichocomaceae</i>
Gênero	<i>Penicillium</i>
Espécie	<i>Penicillium sclerotigenum</i>

Fonte: Adaptado de IMA, 2012

*Penicillium sclerotigenum* também é capaz de produzir roquefortina C e D e gregatinas as duas primeiras são moléculas originadas de triptofano, histidina e terpeno (DMA-dimetialil), que apresentam potencial farmacêutico com atividade antibiótica e podem ser neurotóxicas (FRISVAD e FILTENBORG, 1990), as gregatinas são moléculas fitotóxicas e com potencial ação antibiótica (SAMSON *et al.*, 2004).

Joshi *et al.* (1999) identificaram a produção de esclerotigenina por isolados de *P. sclerotigenum*, sendo esta substância classificada como benzodiazepina com atividade inseticida. Além de substâncias que possuem ação farmacológica, o *P. sclerotigenum* produz a micotoxina patulina.

## 2.4 Micotoxinas

O termo micotoxinas é derivado da palavra grega "mykes" que significa fungo e do latim "toxican" que significa toxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por um grande número de fungos.

As principais micotoxinas são divididas em Aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*; Ocraxotinas produzidas pelo *A. ochraceus* e várias espécies do gênero *Penicillium*; Fusariotoxinas (tricotecenos, zearalenona, fumosinas) produzidas por diversas espécies de *Fusarium* e a Patulina produzida por espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Biossochlamys* (DILKIN, 2002; PATERSON *et al*, 2004).

Essas substâncias tóxicas podem ser produzidas pelos fungos que contaminam os alimentos durante toda a cadeia produtiva, levando a grandes perdas para a agricultura. Estima-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas e grãos produzidos no mundo são perdidos por causa de contaminação por Mtx (BENETT e KLICH, 2003; LAWLOR e LYNCH, 2001). Através da ingestão de alimentos contaminados, homens e animais podem ser contaminados e desenvolver uma série de danos à saúde como, por exemplo, câncer, mutações, nefropatias, diminuição ou até mesmo inibição da fertilidade, além de poder levar a morte, sendo essas doenças denominadas micotoxicoses. Esses efeitos dependem da dose e da frequência de ingestão da Mtx apresentando-se de forma aguda devido ao consumo de doses elevadas ou subaguda resultado de doses menores (BENNETT e KLICH, 2003; MURPHY *et al.*, 2006; SHEPHARD, 2008). A Organização das Nações Unidas estima que 40% da redução na expectativa de vida em países pobres está relacionada com a presença de Mtxs nas dietas destas populações (KAWASHIMA, 2004). Portanto, Mtxs representam um enorme problema para economia e a saúde pública.

### 2.4.1 Patulina

A patulina foi isolada pela primeira vez por Birkinshaw *et al.* em 1943 a partir do *Penicillium griseofulvum* e *Penicillium expansum*. A patulina é produzida por algumas espécies de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*. As espécies de *Penicillium* que já foram identificadas como produtoras de patulina são: *P. carneum*, *P. clavigerum*, *P. concentricum*, *P. coprobium*, *P. dipodomyicola*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. gladioli*, *P. griseofulvum*, *P. marinum*, *P. paneum*, *P. sclerotigenum* e *P. vulpinum* (FRISVAD *et al.*, 2004).

A patulina (4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-ona) (Fig. 3) é uma micotoxina termo-resistente caracterizada como uma lactona de fórmula  $C_7H_6O_4$  e peso molecular 154,12 Daltons. Apresenta estabilidade em ácidos diluídos e resistente a temperatura de 125 °C na faixa de pH entre 3,5 e 5,5. Apresenta absorção UV máxima 256,5 nm e solubilidade em água e solventes orgânicos com exceção de benzeno e éter de petróleo (NIELSEN *et al.*, 2003; MOAKE *et al.*, 2005).

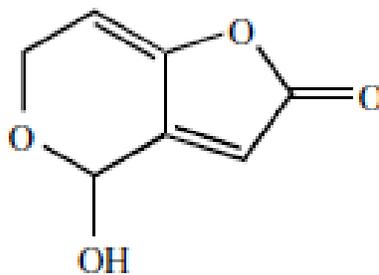


Figura 3 – Estrutura química da patulina.

#### 2.4.1.1 Síntese da Patulina

A via biossintética da patulina envolve 10 reações bioquímicas, 15 enzimas e alguns co-metabólitos (Fig. 4) (PUEL e OSWALD, 2010). O primeiro passo da síntese é a formação do ácido 6-metilsalicílico (6MSA) por meio da condensação de uma molécula de acetil-CoA e três unidades de malonil-CoA pela ação da enzima 6-metil salicílico sintetase. O próximo passo é a conversão do 6MSA por meio da enzima 6-metil salicílico descarboxilase em m-cresol. Posteriormente, a atuação da m-cresol 2-hidroxilase transforma o m-cresol em álcool m-hidroxibenzil (composto intermediário da via biossintética da patulina) ou toluquiol (co-metabólito). Na próxima reação o álcool m-hidroxibenzil origina o álcool gentisil e este por hidroxilação forma o gentisil aldeído ou filostina. O gentisil aldeído é transformado em isoepoxidon pela isoepoxidon dehidrogenase (IDH). Isoepoxidon é convertido em filostina, neopatulina, ascladiol e finalmente em Patulina (MOAKE *et al.*, 2005; PUEL e OSWALD, 2010).

Um passo chave na síntese na micotoxina é a conversão do isoepoxidon em fillostina catalizada pela IDH. Em 2000, Paterson *et al.* descreveram uma sequência curta de nucleotídeos (*primer*) para o gene *idh* da enzima IDH da via metabólica de síntese da patulina em *Penicillium expansum*. O gene *idh* codificada a IDH e sua presença está correlacionada a produção de patulina (PATERSON, 2006). Dessa forma, o gene *idh* pode ser utilizado para triagem de fungos toxigênicos e no desenvolvimento de novos dispositivos para detecção de fungos.

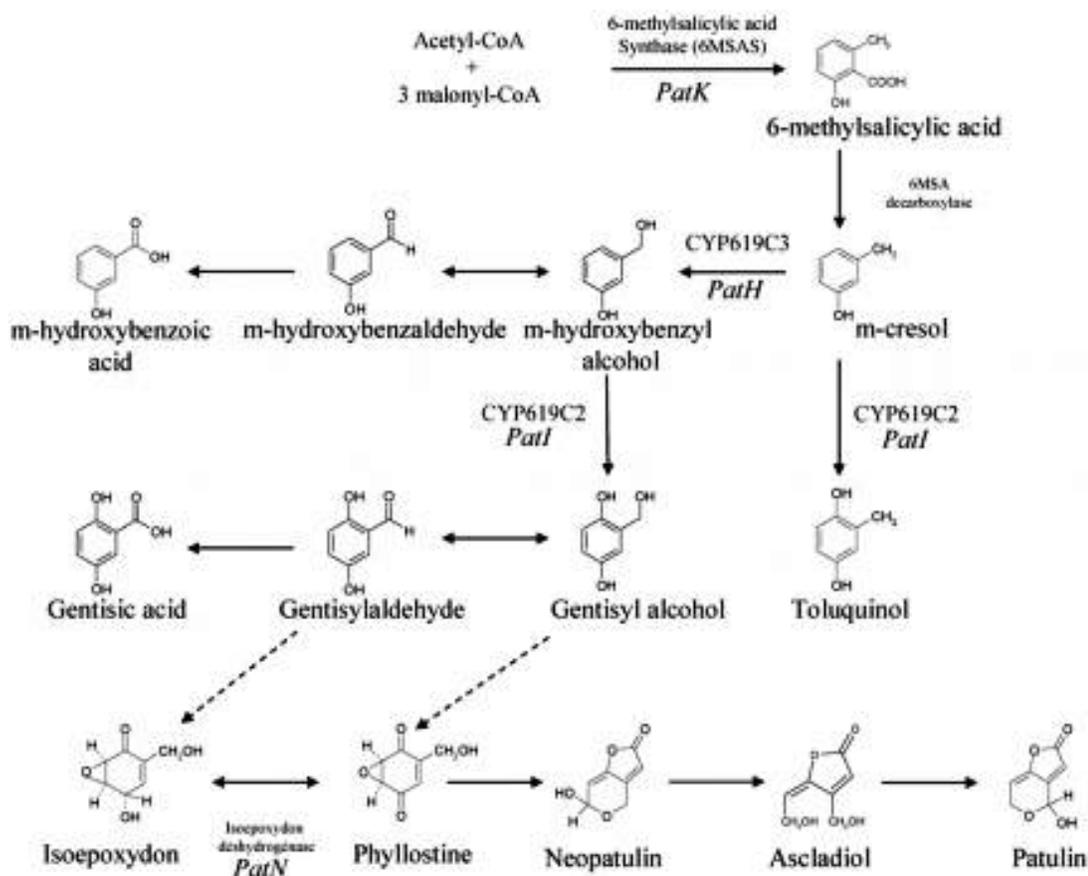


Figura 4 – Esquema da biossíntese da patulina. Fonte: Puel e Olwald, 2010.

#### 2.4.1.2 Toxicologia

Após o isolamento da patulina vários estudos foram realizados para descobrir se esta molécula apresentava alguma atividade biológica. Observou-se que a substância possuía atividade antibiótica (atuando em mais de 75 tipos de bactérias), antifúngica, antiviral e antiprotozoária. Ainda na década de 40, foi sugerida a utilização da patulina no tratamento de congestão nasal e constipação. Durante a década de 50 foi comprovado que a patulina era tóxica a plantas e animais, sendo classificada em 1960 como Mtx (MOAKE *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2008) e portanto não mais utilizada no tratamento dessas patologias.

A patulina é encontrada com frequência em sucos de frutas principalmente maçã e pêssego, trigo, pó de cacau, queijo, salame, feijão,

soja, milho, cevada, presunto, amendoim, plantas forrageiras e silagem. A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas do fruto, sendo que a intensidade de difusão desta micotoxina é de 2 cm em direção ao tecido sadio em maçã (RYCHLIK e SCHIEBERLE, 2001).

Diversos estudos têm sido realizados e os resultados demonstraram que a patulina é mutagênica e apresenta efeito neurotóxico, imunotóxico, genotóxico e gastrointestinal (HOPKINS, 1993). A patulina afeta principalmente órgãos com um maior suprimento sanguíneo, como o cérebro, fígado e rins (BENETT e KLICH, 2003).

A dupla ligação presente no anel lactona pode apresentar a capacidade de interagir com ácidos nucleicos afetando a transcrição gênica e a síntese de biomoléculas (MOULE e HATEY, 1977; HATEZ e GAYE, 1978; MIURA, HASUMI e HENDO, 1993; ARAFAT e MUSA, 1995). Em camundongos a dose de letalidade (DL50) varia de 5 a 30 mg/Kg de peso corpóreo (BOONZAAIJER *et al.*, 2005).

#### 2.4.1.3 Regulamentação para Patulina

Tendo em vista o grande potencial da patulina em causar danos à saúde, alguns países decidiram estabelecer o limite máximo da micotoxina em alimentos (Tabela 3).

Um documento publicado pelo órgão de vigilância de alimentos e medicamentos (*Food and Drug Administration - FDA*) dos Estados Unidos intitulado como "*The Draft Guidance Document of FDA Components and Industry on Apple Juice and Apple Juice Products*" estabeleceu como 50 µg/L o nível máximo aceitável de patulina em sucos de maçã e derivados. Já a União Européia adota este limite e também 25 µg/Kg em compotas e purês de maçã e 10 µg/Kg para produtos destinados ao consumo de crianças (WHO, 1995; *The Commission of the European Communities*, 2006).

Tabela 3 – Limites máximos permitidos de patulina em diversos países.

<b>País</b>	<b>Tipo de Alimento</b>	<b>Limite</b>
<b>Uruguai</b>	Suco de frutas	50 µg/Kg
<b>Estados Unidos</b>	Sucos de maçã e produtos de suco de maçã	50 µg/Kg
<b>Suíça</b>	Suco de frutas	50 µg/Kg
<b>Israel</b>	Suco de maçã	50 µg/Kg
<b>França</b>	Suco de maçã e produtos derivados	50 µg/Kg
<b>Itália</b>	Sucos e frutas	50 µg/Kg
<b>Grécia</b>	Café cru, suco e produtos de maçã	50 µg/Kg
<b>Noruega</b>	Suco de maçã concentrado	50 µg/Kg
<b>Suécia</b>	Suco de frutas	50 µg/Kg
<b>Finlândia</b>	Todos os alimentos	50 µg/Kg
<b>Romênia</b>	Todos os alimentos	50 µg/Kg
	Rações	30 µg/Kg
<b>República Tcheca</b>	Todos os alimentos	50 ppb
	Alimentos para crianças	30 ppb
	Alimentos infantis	20 ppb
<b>Brasil</b>	Suco e polpas de maçã	50 µg/Kg

Adaptado de Fonseca (2012).

Até recentemente o Brasil não possuía uma legislação própria sobre os limites máximos de micotoxinas tolerados nos alimentos (NUNES, 2008). Em 2011, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, aprovou o Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos, a resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Nesse documento fica disposto o limite máximo de 50 µg/Kg de patulina permitido para sucos e polpas de maçã (ANVISA, 2011).

Atualmente, a detecção de fungos em alimentos é realizada por meio da CPP de bolores e leveduras e a detecção de Mtx ocorre por meio de técnicas analíticas convencionais de química, tais como, Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência as quais são aceitas e validadas para análises em alimentos. Considerando a dificuldade de métodos de identificação de fungos toxigênicos e micotoxinas com características que agreguem especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez, praticidade e fácil interpretação, surgiram os biossensores, como excelente alternativa tanto para detecção de fungos toxigênicos bem como para a própria toxina no alimento.

### *2.5 Métodos de identificação e detecção de fungos toxigênicos em alimentos*

A detecção e identificação de fungos são realizadas através da utilização de métodos convencionais baseados em meio de cultura, análises macroscópicas, microscópicas e bioquímicas (MEIRELLES, 2006; WENGENACK E BINNICKER, 2009). Os métodos macroscópicos e microscópicos avaliam as características morfológicas das estruturas reprodutivas dos fungos (esporos), enquanto os bioquímicos a produção de metabólitos secundários, análise de quitina e ergosterol. Na análise da colônia são observadas características tais como, cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, além da velocidade de crescimento do fungo. Na microscopia são observadas as estrutura que compõem o fungo tais como, hifas hialinas (translúcidas, assumem a cor do pigmento utilizado) ou demácia (fungo negro que possui pigmento melanóide), septadas ou asseptadas, forma, disposição, tamanho e formação dos esporos. Um fator importante na identificação dos fungos é a definição do gênero e da espécie e a metodologia convencional às vezes não permite a classificação para espécies próximas. Dessa forma, é possível visualizar que a identificação utilizando os métodos clássicos exige técnicos com experiência, demandam tempo, apresentam baixa especificidade, precisão e reprodutibilidade (MEIRELLES, 2006; WENGENACK e BINNICKER, 2009).

Os imunoenaios tornaram-se uma ferramenta analítica alternativa na análise de fungos em alimentos, destacando-se o ensaio imunoenzimático ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Esta técnica é desenvolvida em microplacas contendo vários poços onde são depositados os reagentes e baseia-se na interação antígeno-anticorpo. A reação ocorre por meio da identificação de anticorpos e/ou antígenos através de anticorpos marcados com uma enzima, de maneira que o substrato sofre uma reação enzimática que resulta numa de cor do cromógeno. O produto da reação, além de colorido, é insolúvel para não difundir do local da formação. Os imunoenaios constituem técnicas bioanalítica aplicáveis em diversas áreas da ciência de alimentos, incluindo análise microbiológica, nutrição, controle de qualidade e de processo (FRANK, 2004). Os ensaios utilizando exoantígenos são os mais empregados na detecção e identificação de fungos toxigênicos. Os exoantígenos são macromoléculas imunogênicas produzidas por fungos durante o seu desenvolvimento e secretadas no meio de cultura. No entanto, o custo do desenvolvimento de um ensaio imunológico é elevado e existe a possibilidade de reação cruzada com exoantígenos produzido por outros fungos (KAUFLMAN, 1987).

Atualmente existe uma tendência na utilização de diversas técnicas moleculares tais como, reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização fluorescente *in situ* (FISH), DNA array para detectar e identificar espécies de fungos, entretanto, estes são métodos utilizados apenas na pesquisa (WENGENACK E BINNICKER, 2009). A técnica de PCR consiste na amplificação seletiva de sequências de DNA de comprimento definido. Para a obtenção das fitas de DNA são necessárias quatro etapas: 1) extração do DNA que contem a região a ser amplificada; 2) escolha do segmento a ser amplificado e obtenção dos primers específicos para o reconhecimento do segmento; 3) amplificação que dará origem a várias cópias, nessa etapa é utilizada um termociclador; 4) leitura do produto amplificado através de eletroforese e coloração (FUNGARO, 2000).

FISH é um método que utiliza um microscópio de epifluorescência para detecção de sondas ligadas a molécula de DNA ou RNA. A técnica

permite visualizar a localização precisa de sequências particulares de DNA ou RNA no citoplasma, organelas ou núcleos de materiais biológicos. Esse processo envolve a preparação das amostras e marcação de uma sequência de ácido nucleico com um composto fluorescente para formar uma sonda. A sonda é hibridada com o DNA ou RNA do material biológico formando um duplex e posteriormente os sítios de hibridação são detectados e visualizados com o auxílio de um microscópio de epifluorescência (WENGENACK E BINNICKER, 2009).

O ensaio de DNA (do inglês *DNA array*) é uma técnica baseada na hibridação de regiões de interesse do genoma amplificado e marcado para imobilização de fitas de oligonucleotídeos sob uma plataforma sólida. As cópias das regiões do gene alvo, são amplificadas por PCR e marcadas com digoxigenina e submetida ao processo de hibridação, um resultado positivo gera um sinal quimioluminescente que pode ser detectado por filme de raios-X ou uma câmera digital em salas escuras e as imagens capturadas são analisadas por um programa de computador (PETERSON *et al.*, 2000; WENGENACK e BINNICKER, 2009).

Os métodos moleculares embora sejam rápidos e apresentem boa especificidade, exigem suporte de alta tecnologia, pessoal qualificado, demandam tempo e possuem alto custo (TSUI *et al.*, 2011).

Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento de novas técnicas de detecção e identificação de fungos toxigênicos em alimentos que superem as limitações dos métodos atuais. Em adição, para a geração destes novos produtos tecnológicos devem ser observadas algumas variáveis, tais como, rapidez, especificidade, reprodutibilidade e excelente sensibilidade. Portanto, os biossensores vêm se tornando um tema estratégico.

## *2.6 Biossensores*

Os biossensores são dispositivos analíticos que incorporam um elemento de reconhecimento biológico ou biomimético conectado a um transdutor. O elemento sensor é capaz de detectar a presença, a atividade ou a concentração da amostra em análise (D'ORAZIO, 2003). Esta camada sensora pode ser um micro-organismo, um anticorpo, oligonucleotídeos, lectinas, enzimas, aptâmeros, polímeros de impressão molecular – PIM (matrizes sintetizadas, que possuem a capacidade de reconhecer e interagir com a molécula alvo) - ou qualquer outra biomolécula que possa interagir com substrato alvo (D'ORAZIO, 2003). A escolha do material biológico ou biomimético é motivada pelas características dos compostos a serem analisados e a eleição do transdutor é definida pelo elemento de reconhecimento complementar, pois são eles que determinam as alterações nas propriedades físico-químicas provenientes do processo de biorechecimento.

O princípio de detecção é baseado na ligação específica entre o analito e o elemento de reconhecimento complementar imobilizado sob um suporte sólido adequado (Fig. 5). A interação desses dois componentes resulta em alterações de uma ou mais propriedades físico-químicas como alterações de pH, transferência de elétrons, alteração de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons específicos, essas mudanças são captadas e transformadas em um sinal eletrônico mensurável pelo transdutor. O principal objetivo do biossensor é produzir um sinal eletrônico proporcional à concentração de uma substância específica ou grupo de substâncias (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003).

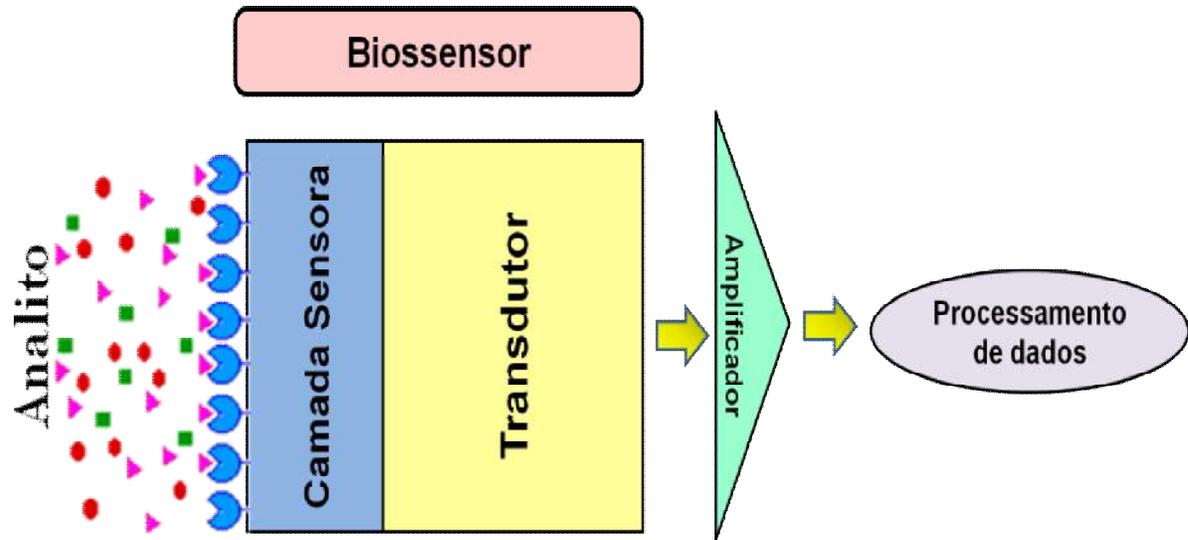


Figura 5 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.

### 2.6.1 Classificação dos sistemas de transdução

Os transdutores eletroquímicos são os mais antigos e comumente utilizados (CONROY et al.; 2009). São caracterizados por sua capacidade de mensurar as mudanças eletroquímicas que ocorrem quando um sinal químico é produzido pela interação do sistema de reconhecimento e o analito. Os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em: potenciométrico, amperométrico, condutimétrico e impedânciométrico. A detecção utilizando biossensores amperométricos é realizada através da mensuração da corrente gerada pela oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície de um eletrodo de trabalho quando um potencial é aplicado. Neste método a medida da corrente é proporcional à concentração das espécies em solução e estas por sua vez são diretamente correlacionadas com a do analito. No transdutor potenciométrico é mensurada a diferença de potencial entre dois eletrodos quando é aplicada uma corrente elétrica constante. O condutimétrico utiliza como fonte de dados às mudanças na condutância entre dois eletrodos quando um potencial alternado é aplicado, já o impedânciométrico esta relacionada à habilidade do material sensor detectar variação na impedância do eletrodo (D'ORAZIO, 2003; RUMAYOR, 2005; RAHAIE e KAZEMI 2010).

Os transdutores ópticos se baseiam nas variações das propriedades da luz como consequência da interação físico-química entre o analito e elemento de bioreconhecimento, como mudanças na absorção, luminescência, fluorescência, dispersão ou índice de reflexão (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003). Estes transdutores podem ser biossensores de fibra óptica, biossensores de ressonância de plásmons e biossensores de ondas evanescentes.

Os sensores de fibra óptica consistem de uma fibra óptica onde em uma das extremidades é imobilizado o elemento de reconhecimento e na outra o elemento de detecção. Neste tipo de técnica é necessária a utilização de um marcador opticamente ativo como corantes sensíveis ao pH, a concentração de oxigênio, peróxido de hidrogênio, moléculas fluorescentes e bio ou quimioluminescentes. O mecanismo de detecção seria possível através de mudanças detectadas pelo marcador proveniente da interação do elemento de reconhecimento com o analito que se propagariam ao longo da fibra óptica para um detector (MELLO e KUBOTA, 2002; RUMAYOR *et al.*, 2005).

A ressonância de plásmons de superfície é um fenômeno óptico que ocorre quando a luz polarizada é dirigida de um meio de maior índice de refração (prisma) para um meio de menor índice de refração (uma camada metálica de ouro ou prata), que se encontra entre o prisma e a amostra. A luz que incide sobre a interface prisma/metal modifica o plásmons da superfície, que são oscilações coletivas dos elétrons de condução em um metal, para um determinado ângulo de incidência da luz, chamado de ângulo de ressonância. Dessa forma, o reconhecimento do analito, provoca alterações no ângulo de ressonância e essas mudanças são proporcionais à concentração do analito (HALL, 2002; RUMAYOR *et al.*, 2005).

As ondas evanescentes se baseiam no fenômeno conhecido como reflexão interna total da fluorescência, que consiste na absorção e emissão de fótons. É um tipo de sensor onde a radiação viaja por meio de um guia de onda por reflexão interna total, criando um campo eletromagnético denominado campo evanescente. Qualquer interação molecular que venha a

ocorrer no campo evanescente produz alterações nas características de propagação da luz através da guia de ondas que pode ser medida e relacionada com a concentração do analito, é importante salientar que nessa técnica se faz necessário utilizar moléculas fluorescentes (PATEL, 2002; RUMAYOR *et al.*, 2005).

Os transdutores piezelétricos são constituídos por um material piezelétrico que pode entrar em ressonância quando um campo elétrico alternado é aplicado. Nesse tipo de transdutor geralmente são utilizados materiais como o cristal de quartzo e a frequência de oscilação do campo é uma função da massa, ou seja, alterações na frequência de oscilação ocorrem como resultado de mudanças de massa na superfície do cristal. Portanto, quando o analito interage como elemento de reconhecimento imobilizado na superfície do cristal promove mudanças na massa e por consequência alterações na frequência de oscilação (CHANG *et al.*, 2000, TANIWAKI *et al.*, 2006).

Os transdutores térmicos se baseiam na detecção do calor gerado por meio das reações exotérmicas e pode ser relacionado com a concentração do analito. As mudanças na temperatura são determinadas por meio de termoresistores de entrada e saída do dispositivo que se encontra a biomolécula imobilizada (CHANG *et al.*, 2000; RUMAYOR *et al.*, 2005).

Os transdutores nanomecânicos são constituídos por uma microplaca de silício, onde o elemento de reconhecimento é imobilizado na superfície. Neste transdutor o processo de biorechecimento promove alterações na tensão superficial do líquido e a microplaca sofre uma resposta do tipo nanomecânico que consiste em mudanças da deflexão e/ou da frequência de ressonância (ÁLVAREZ *et al.*, 2003; RUMAYOR *et al.*, 2005).

### 2.6.2 Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com algumas variáveis, como seguem:

- Tipo de interação: os biocatalíticos utilizam biocatalizadores como enzimas, organelas, células que favorecem reações químicas havendo a formação de um ou mais produtos, sem que ocorra o consumo do biocatalisador, que pode ser regenerado e reutilizado; e os de bioafinidade, que são baseados na ligação específica entre o receptor e o analito, formando um complexo entre os dois componentes. Nesse tipo de interação diferentes tipos de elementos de reconhecimento podem ser utilizados como, lectinas, anticorpos e oligonucleotídeos (RAHAIE e KAZEMI 2010);
- Método de detecção: os biossensores podem ser divididos em diretos e indiretos dependendo da técnica utilizada para detectar a interação entre o elemento de reconhecimento e o analito (JIMÉNEZ e LEÓN, 2009). No método indireto é realizada a detecção de uma substância produzida através da interação do elemento de reconhecimento com o analito, já no método direto as alterações físico-químicas são captadas através da ligação direta do elemento de reconhecimento com o analito sem a produção de substâncias;
- Elemento de reconhecimento: célula, organela, enzima, anticorpo, ácido nucléico, tecido, aptâmeros, PIM, ácido nucléico peptídios (RAHAIE e KAZEMI 2010);
- Sistema de transdução: eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e impedânciométrico), óptico, piezelétrico, termoelétrico, nanomecânico (KREJCOVA et al., 2012).

### 2.6.3 Técnicas para Imobilização de Biomoléculas

A imobilização do sensor biológico sob a superfície do transdutor é um passo essencial na construção dos biossensores. A escolha da técnica depende de alguns fatores como, a natureza do elemento biológico, o tipo de transdutor, as propriedades físico-químicas da substância e as condições de trabalho do biossensor (RUMAYOR *et al.*, 2005). Além disso, elas devem possibilitar uma ligação estável entre a superfície e o elemento de reconhecimento, sem que isso interfira na atividade biológica do sistema (TEDESCHI *et al.*, 2003). Os métodos mais utilizados na imobilização de biomoléculas são: adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada (*cross-linking*) e aprisionamento ou oclusão (MELLO e KUBOTA, 2002) (Fig. 6).

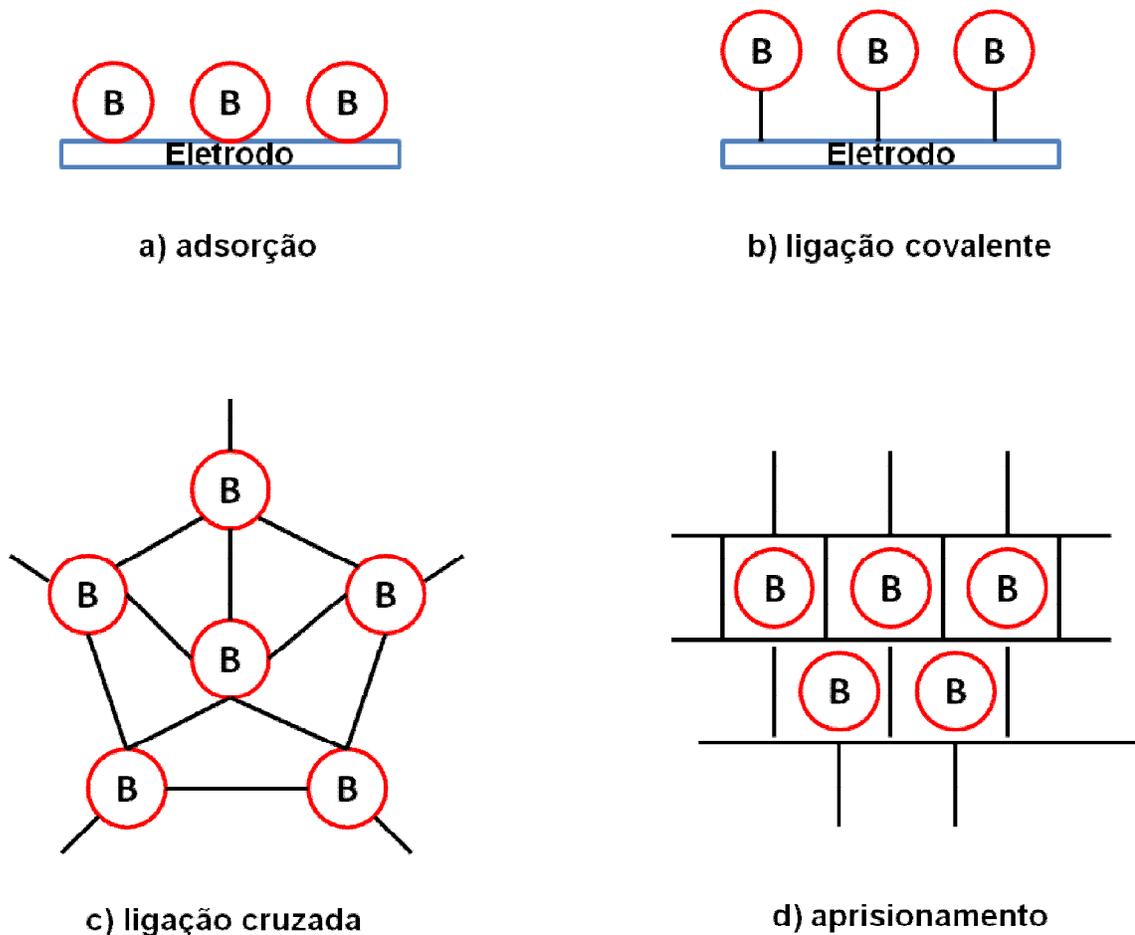


Figura 6 – Representação dos métodos de imobilização de biomoléculas (círculo vermelho com letra B).

A adsorção física é um processo onde a biomolécula é imobilizada próxima à superfície do transdutor por meio de uma matriz. A interação ocorre por meio de forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, ligações iônicas e formação de sítios complexos de transferência de elétrons. As matrizes utilizadas na imobilização podem ser sílica gel, celulose, colágeno, hidroxiapatita e acetato. Essa técnica apresenta algumas vantagens como, baixo custo, rapidez, simplicidade, ausência de modificação da biomolécula e possibilidade de regeneração da matriz. Entretanto, apresenta uma frágil união da biomolécula com a matriz, pois as forças de ligação são influenciadas por mudanças de pH, temperatura e força iônica do meio (SOUZA, 1997; D'SOUZA, 2001).

Na técnica de ligação covalente a biomolécula é ligada através de ligações químicas entre os grupos funcionais da biomolécula e a matriz suporte ou diretamente no transdutor. Nesse método geralmente são utilizados filmes poliméricos os quais podem ser sintetizados por eletropolimerização através do uso de solventes orgânicos e altos valores de potenciais para polimerização, entretanto essas condições podem causar danos a biomoléculas. Para preservar a atividade catalítica e/ou de bioreconhecimento a ligação covalente entre a biomolécula e o polímero funcionalizado pode ser realizada em solução tampão contendo aditivos e estabilizantes. A técnica de ligação covalente apresenta algumas vantagens como, por exemplo, baixa resistência difusional e estabilidade em condições extremas, entretanto, possui como desvantagem o fato da matriz não ser regenerada (COSNIER, 1999; D'SOUZA, 2001; MELLO E KUBOTA, 2002).

O método de ligação cruzada utiliza para imobilização da biomolécula ao suporte sólido um agente funcional como glutaraldeído, hexamileno diisocianato, 2,4 dinitro-benzeno. As vantagens dessa técnica são estabilidade em condições extremas, custo moderado, a perda da atividade do componente biológico é mínima. As desvantagens são tratamento com substâncias químicas tóxicas, difícil controle da reação de imobilização, grande quantidade de biomaterial necessário para reação e não é possível regeneração (GIL et al., 1999; D'SOUZA, 2001; MELLO E KUBOTA, 2002).

No método de aprisionamento ou oclusão a biomolécula é confinada a uma matriz polimérica ou gel. No caso do gel a biomolécula é misturada a um monômero em solução, este ao se polimerizar em forma de gel aprisiona a biomolécula. Nesse tipo de matriz alguns fatores difusionais, pois o material que reveste a biomolécula pode apresentar resistência da molécula alvo, dessa forma, ocorrendo impedimento estérico quando os poros da matriz são menores do que a moléculas alvo. Outra forma de aprisionamento da biomolécula em um eletrodo é através de eletrodeposição de um polímero, que pode ser polianilina polipirrol, entre outros juntamente com a biomolécula em solução. Esse método envolve aplicação de um potencial apropriado sob o eletrodo de trabalho imerso na solução contendo a biomolécula e o monômero. A biomolécula é então aprisionada durante o crescimento do polímero. O método de aprisionamento ou oclusão apresenta como vantagens, simplicidade, baixo custo, necessidade de pouca quantidade de biomolécula não ocorre modificações no elemento de reconhecimento, proximidade entre o elemento de reconhecimento e o transdutor e como desvantagens, ligação frágil, possibilidade de impedimento estérico, não é possível a regeneração (MELLO E KUBOTA, 2002; D'SOUZA, 2001; EDSON, 2012).

#### *2.6.4 Aplicações dos Biossensores*

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lyons em 1962 e consistia na enzima glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida sob a superfície de um eletrodo de platina amperométrico para medir a pressão de oxigênio. O processo de reconhecimento utilizado por este biossensor conhecido como "eletrodo enzima", ocorre através da oxidação da D-glicose em D-glucono- $\delta$ -lactona (ácido glutâmico) pela ação da enzima glicose oxidase, como consequência ocorre consumo de oxigênio que é proporcional á concentração do substrato, ou seja, é determinada a quantidade de glicose. Este biossensor começou a ser comercializado a partir de 1975 pela *Yellow Springs Instrument Company* (RUMAYOR, 2005).

No ano de 1977, foi desenvolvido o primeiro dispositivo que utilizava como camada de reconhecimento, micro-organismos vivos imobilizados na superfície de um eletrodo sensível a amônia. O objetivo do trabalho foi construir um sistema passível de detecção do aminoácido arginina e os criadores o denominaram de sensor bio-seletivo. Posteriormente, a denominação sensor bio-seletivo foi transformado em biossensor e foi a partir desse momento que o termo biossensor surgiu na literatura científica (D' ORAZIO, 2003).

As aplicações dos biossensores são diversas e incluem diagnósticos clínicos, indústria farmacêutica, controle ambiental para monitoramento de substâncias como fenóis, pesticidas, e metais pesados, na indústria alimentícia para análise de composição de alimentos, contaminação microbiana, concentração de nutrientes e corantes (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003; ROGERS, 2006; BALLERSTADT *et al.*, 2006; KAPPEL *et al.*, 2007; VÄLIMAA *et al.*, 2010; MARAGOS e BUSMAN, 2010).

No diagnóstico clínico podemos salientar a utilização dos genossensores, um tipo específico de biossensor baseado em fenômenos da química dos ácidos nucleicos como, por exemplo, o processo de hibridação. Os ácidos nucleicos têm sido bastante utilizados no desenvolvimento de biossensores para detecção de drogas, identificação de micro-organismos patogênicos e outras substâncias biológicas, como também no diagnóstico de doenças (ROGERS, 2006). A técnica sensorial por meio da hibridação envolve a imobilização de uma sonda de oligonucleotídeo sobre a superfície de um transdutor e posterior exposição do sensor a uma amostra contendo a sequência complementar (oligonucleotídeo alvo) com consequente hibridização (PEJCIC e DE MARCO, 2006).

Para a melhoria da resposta eletroquímica vem sendo utilizados diversos sistemas, principalmente possuindo nanopartículas metálicas presentes na camada oclusora. Desta forma, podemos destacar uma nova classe de compostos denominados de compósitos que atualmente tem sido

utilizado como camada sensorial, sendo formados a partir da associação de polímeros e nanopartículas metálicas.

### 2.7 Compósitos

Um material compósito que pode ser utilizado na construção da camada sensora (Fig. 5) é formado por duas ou mais fases física e/ou quimicamente distintas, sendo uma contínua (matriz) e a outra dispersa (reforço). As suas propriedades são obtidas por meio da combinação das propriedades dos compostos individuais. A matriz é responsável por proteger o reforço do ambiente externo, pela distribuição e transferência da tensão para o reforço, além disso, confere estrutura ao compósito preenchendo os espaços vazios que ficam entre a fase dispersa. O reforço confere rigidez e resistência, é função da fase dispersa realçar as propriedades mecânicas, eletromagnéticas ou químicas do compósito (FOWLER *et al.*, 2006; CAMPBELL, 2010).

Quando pelo menos um dos componentes do compósito apresenta dimensões em escala nanométrica, este passa a ser denominado de nanocompósito. Os nanocompósitos podem ser de natureza inorgânica/inorgânica, orgânica/orgânica e inorgânica/orgânica, sendo este último denominado de nanocompósito híbrido por combinar as propriedade de materiais de naturezas distintas (ESTEVES *et al.*, 2004).

Uma das principais razões da associação de diferentes compostos para formar um único material é que este novo material pode exibir propriedades distintas daquelas que caracterizam cada um de seus componentes, como também uma combinação dessas propriedades. Assim, pela adequada combinação dos componentes, um compósito pode reunir um conjunto de propriedades convenientes e desejáveis (DE MELO e PIMENTA, 2004).

Dentre as numerosas aplicações dos nanocompósitos podemos destacar eletrônica, dispositivos magnéticos, tintas e revestimentos, materiais retardadores de chama, catálise, biossensores ópticos e

eletroquímicos (JIANG e KAKKAR, 1999; BURKE *et al.*, 2002; FLEMING *et al.*, 2001; HSIUE *et al.*, 2001; GILMAN *et al.*, 2000; GANGOPADHYAY e DE, 2000; WANG *et al.*, 2010; XIAN *et al.*, 2006).

Na construção de compósitos diversos materiais podem ser utilizados, dentre eles podemos destacar os polímeros, como o hidrocloreto de poli(alilamina) (HPA), e as nanopartículas de óxido de ferro (NpsFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) que atuam como matriz e reforço, respectivamente. Este compósito de HPA-NpsFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foi utilizado no presente trabalho.

O HPA é um polieletrólito catiônico que apresenta vários grupos aminas ionizáveis na sua estrutura química, a qual está totalmente protonada em soluções ácidas e neutras e parcialmente desprotonada em soluções ligeiramente básica. Esse polímero tem sido utilizado na construção de materiais híbridos, materiais nanoestruturados e automontados para o desenvolvimento de biossensores (SARTORI *et al.*, 2011).

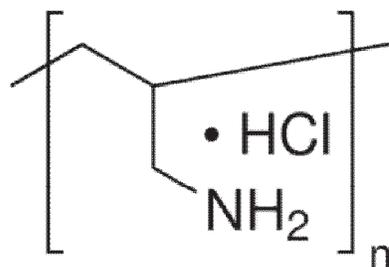


Figura 7 – Estrutura monomérica do HPA

Outro material que tem gerado um grande interesse por apresentar grande aplicabilidade em diversas áreas da ciência são as nanopartículas (NPs). NPs são partículas de dimensões nanométricas. Esta é uma região extremamente pequena, da ordem de 1 a 100 nanômetros. As NPs apresentam uma grande área superficial e geralmente exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas (ESTEVES *et al.*, 2004). Por apresentarem tais propriedades as NPs facilitam a transferência de elétrons, podem ser

modificadas por uma variedade de ligantes e biomoléculas e utilizadas na construção de sensores químicos e bioquímicos (WANG, 2005).

As  $\text{NPsFe}_3\text{O}_4$  também, chamadas de magnetita, apresentam propriedades de biocompatibilidade, aumento da área superficial e superparamagnetismo (GUBIN *et al*, 2005). A combinação das  $\text{NPsFe}_3\text{O}_4$  com o HPA fornece vários sítios de ligação para nucleotídeos, e favorece a amplificação do sinal elétrico, constituindo uma plataforma adequada para imobilização de biomoléculas e conseqüente fabricação de um genossensor para detecção de *fungos* toxigênicos.

## 2.8 Espectroscopia de Impedância Elétrica

A espectroscopia de impedância elétrica (EIE) é um método efetivo para verificar as propriedades interfaciais de uma superfície modificada e é frequentemente utilizado no sentido de compreender transformações químicas e processos associados com os suportes condutores (DONG *et al*, 2001; KATZ e WILLNER, 2003). Sendo empregada como uma ferramenta de caracterização em diferentes áreas como estudo de membranas, suspensões sanguíneas, tecidos biológicos, sistemas coloidais e sensores.

O princípio de funcionamento desta técnica envolve a aplicação de um estímulo elétrico entre os eletrodos dispostos em uma amostra de interesse e a observação da resposta. Onde este estímulo consiste na aplicação de um pequeno potencial elétrico ou corrente sobre o sistema que esta sendo investigado. O sistema é submetido à aplicação de um potencial sobre a qual é imposta uma variação senoidal de potencial de pequena amplitude. Este por sua vez causa alterações mínimas no sistema, reduzindo desta forma possíveis erros causados pela técnica de medição (SANTOS, 1994). Este método possibilita que o sistema seja submetido a pequenos valores de potencial elétrico, em torno de milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos elétricos próximos ao estado de equilíbrio. Como ao potencial aplicado no sistema sob investigação é de pequena amplitude é

possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional (MACDONALD, 1987; SLUYTERS-REHBECH, 1994; BRETT e BRETT, 1996).

O conceito de impedância foi inicialmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas elétricos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema (SLUYTERS-REHBECH, 1994). A impedância de um circuito elétrico mede o impedimento que diferentes elementos (resistor, capacitor, indutor e outros) que constituem um circuito elétrico podem oferecer à passagem de corrente elétrica.

A obtenção de informações a partir dos dados de impedância elétrica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida como, por exemplo, circuitos equivalentes (Fig. 8). A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula elétrica e um circuito elétrico composto por resistores, capacitores e indutores.

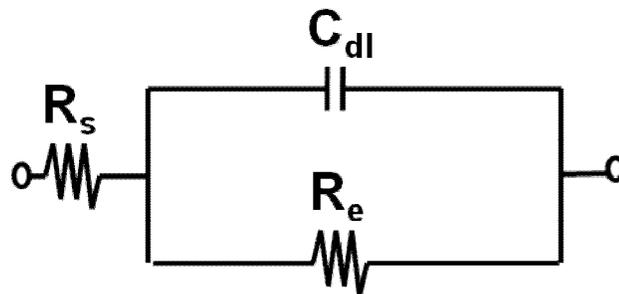


Figura 8 – Modelo de circuito equivalente utilizado em espectroscopia de impedância.  $C_{dl}$  – capacitância de dupla camada elétrica;  $R_s$  – resistência ôhmica da solução;  $R_e$  – resistência a passagem de corrente elétrica.

Para o circuito equivalente apresentado as componentes real ( $Z'$ ) e imaginária ( $Z''$ ) da impedância do sistema são:

$$Z' = R_s + \frac{R_e}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_e^2} \quad (1)$$

$$Z'' = \frac{\omega C_{dl} R_e^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_e^2} \quad (2)$$

Em que,  $R_s$  (resistência ôhmica da solução),  $R_e$  (resistência à passagem de corrente elétrica),  $\omega$  (frequência angular) e  $C_{dl}$  (capacitância da dupla camada elétrica).

Um dos circuitos equivalentes mais utilizados na área de biossensores e que apresenta uma melhor equivalência com um sistema elétrico (interface eletrodo/solução) é o circuito de Randles (BRETT e BRETT, 1996) (Fig. 9).

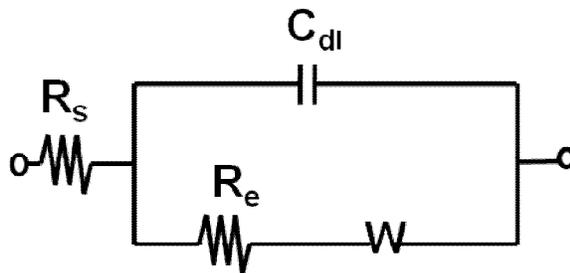


Figura 9 - Modelo de circuito de Randles.  $C_{dl}$  – capacitância de dupla camada elétrica;  $R_s$  – resistência ôhmica da solução;  $R_e$  – resistência a passagem de corrente elétrica,  $W$  – impedância de Warburg.

No circuito de Randles estão presentes quatro elementos que representam os processos que ocorrem nos eletrodos e na solução: a capacitância de dupla camada elétrica ( $C_{dl}$ ), que surge na interface eletrodo/solução devido à distribuição de cargas na interface e possui um comportamento similar a de um capacitor de placas paralelas (modelo Helmholtz); a resistência ôhmica da solução ( $R_s$ ) ao transporte de íons entre os eletrodos; a impedância faradaica ( $Z_f$ ) que pode ser subdividida em uma resistência à passagem de corrente elétrica ( $R_e$ ), esta relacionada ao fluxo de portadores na interface eletrodo/solução ou por conta do movimento de íons na interface quando um potencial é aplicado. Outro elemento que pode ser inserido no circuito de Randles e que é muito específico para circuito em biossensores é impedância de Warburg ( $W$ ) que representa a resistência no transporte de massa das espécies eletroativas (BRETT e BRETT, 1996).

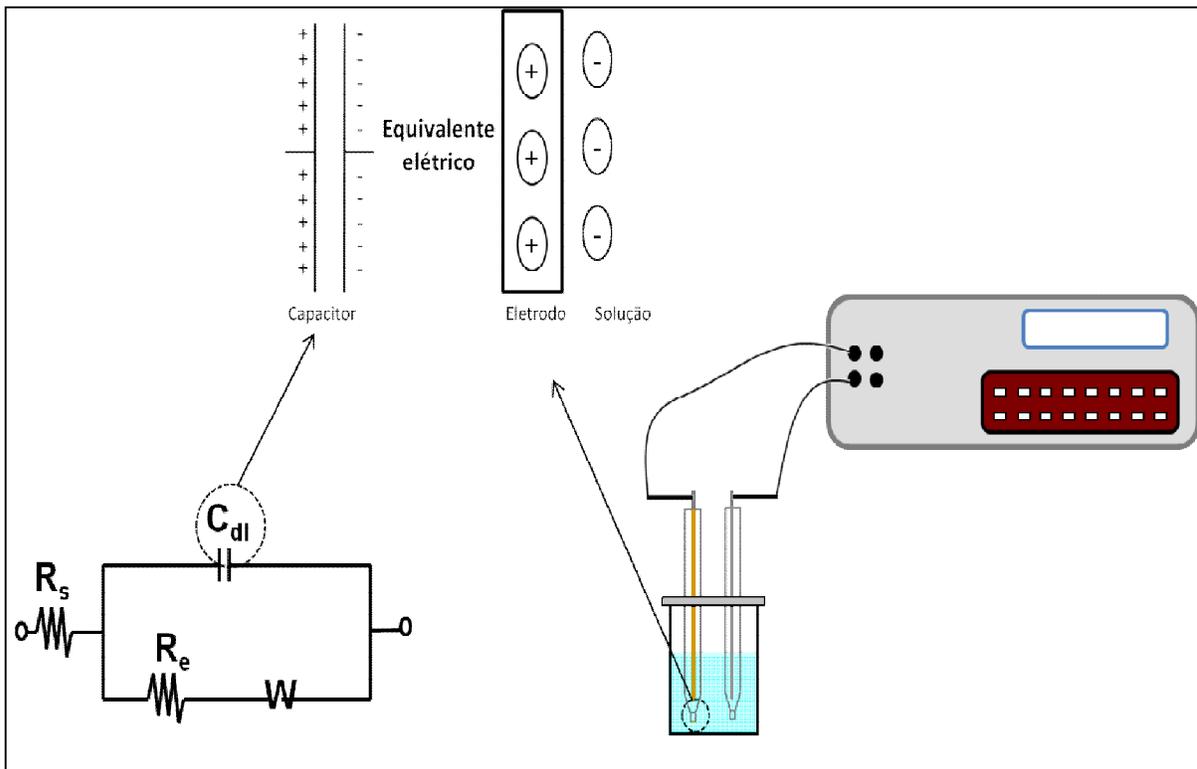


Figura 10 - Representação da semelhança entre um capacitor de um circuito elétrico (modelo Helmholtz) com a interface eletrodo/solução de uma célula elétrica.

Os resultados de impedância podem ser ilustrados de dois modos diferentes: através do diagrama de Nyquist (Fig.11a), no qual podem ser observados os valores da parte capacitiva representada pela componente imaginária ( $Z_{im}$ ), em função da parte resistiva representada pela componente real ( $Z_{re}$ ) e o outro é o diagrama de Bode (Fig.11b), que descreve a relação de  $\log |Z|$  ( $|Z|$ , módulo da impedância) e  $\varphi$  (ângulo de fase) vs  $\log \omega$  ( $\omega$  - frequência).

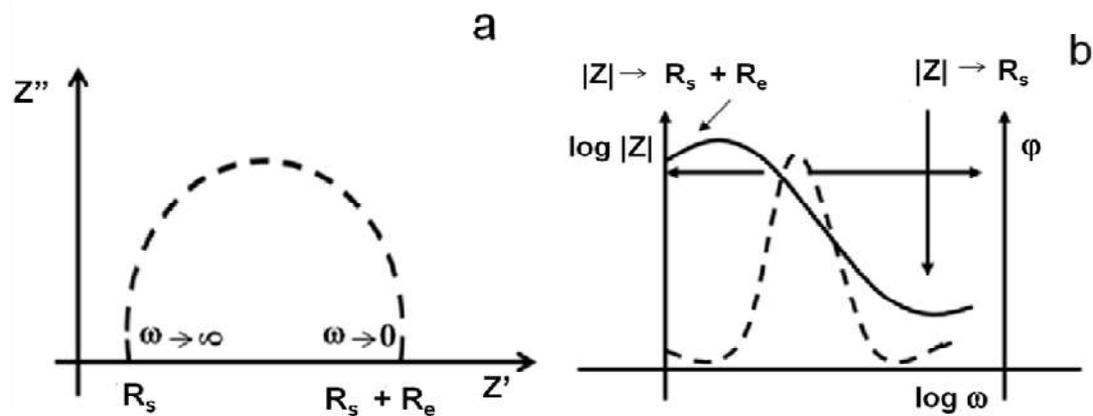


Figura 11 – Diagramas de Nyquist (a) e Bode (b). Fonte: Damos et al, 2004.

A EIE tem sido aplicada em diversos estudos, tais como cinética de eletrodo, estudos de dupla camada, processos em baterias, investigação sobre processos de corrosão, eletroquímica em estado sólido e bioeletroquímica (FEY *et al*, 2003; WANG e LI, 2001; SALKIND *et al*, 2003; CHENG *et al*, 2002).

As aplicações analíticas da EIE têm sido estendidas às investigações de hibridização de oligômeros de DNA, mediante o acompanhamento de impedância total do sistema. Estas investigações são possíveis, pois a impedância total do sistema esta associada ao aumento da componente capacitiva do sistema. Além disso, a componente capacitiva do sistema é resultante de mudanças na densidade e mobilidade de íons associados com a reação de hibridização (GUISEPPI-ELIE e GHEORGE, 2003).

Os métodos elétricos oferecem várias vantagens dentre as técnicas existentes utilizadas na construção de biossensores como seletividade, especificidade, reprodutibilidade, precisão e tempo de resposta, excelente estabilidade química o que possibilita aplicação em diversas áreas.

### *2.9 Microscopia de Força Atômica*

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) foi desenvolvida em Binning, Quate, Gerber em 1986 através de uma colaboração entre a *International Business Machines* (IBM) e a Universidade de Stanford e conferiu aos pesquisadores o prêmio Nobel de física. O AFM surgiu após a observação de que a ponta do *cantilever* do microscópio de tunelamento com varredura exerce forças sobre a superfície da amostra na mesma ordem das forças interatômicas (GARCIA e PÉREZ, 2002; PAIVA, 2003).

O princípio de funcionamento da técnica (Fig. 12) consiste na varredura da superfície da amostra por meio de uma sonda sensível a força, a qual é uma ponta de dimensão atômica integrada a um braço em movimento (*cantilever* flexível). À medida que a ponta se aproxima da superfície, os átomos da ponta interagem com os átomos e as moléculas da superfície do material, causando a deflexão do braço de AFM. Esta deflexão do braço de AFM é medida através da mudança de direção de um feixe laser emitido por um díodo de estado sólido e refletido pelo braço de AFM, sendo o feixe laser refletido captado por um fotodetector. A sonda de AFM segue os contornos da superfície. Durante a deslocação da ponta pela superfície o computador analisa, em cada posição na superfície, a força de interação entre a ponta de AFM e a amostra e traça o diagrama das alturas, construindo a topografia da amostra (HERRMANN *et al.*, 1997).

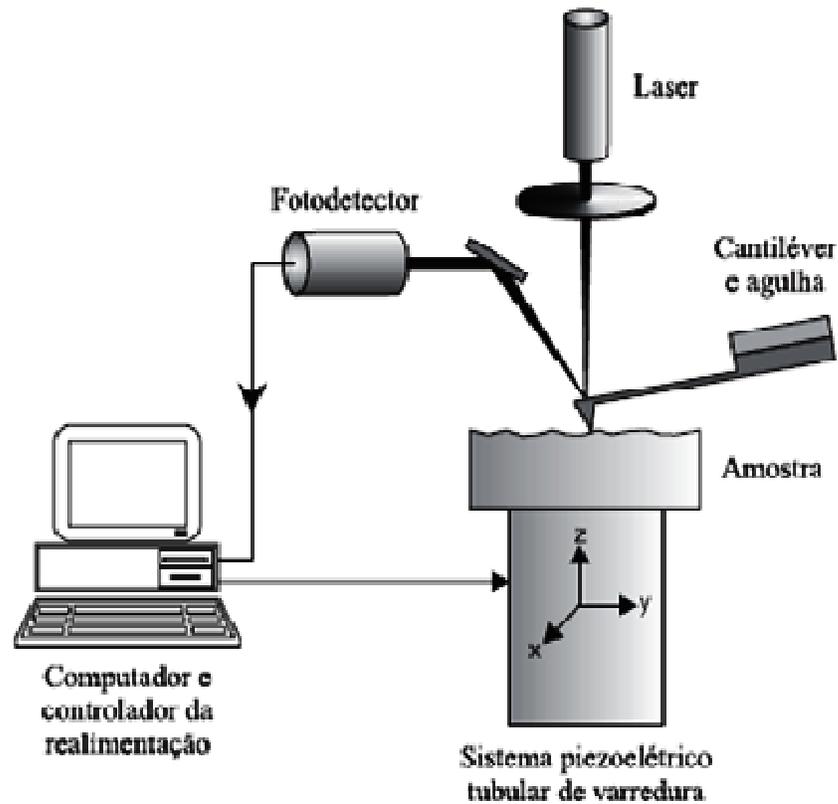


Figura 12 – Representação do princípio de funcionamento do AFM. Fonte: Herrmann *et al*, 1997.

Para alcançar resolução atômica, a ponta termina num conjunto de átomos e a força de atração ou repulsão entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o *cantilever* se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação a qual é dada pela lei de Hooke:

$$F = -Kx \quad (3)$$

sendo,  $F$  a força de atração,  $k$  a constante elástica da ponta que depende de sua geometria e do material de que é constituída e  $x$  o deslocamento do *cantilever*, pela deflexão provocada pela interação (HOWLAND e BENATAR, 1996).

No AFM as forças entre a ponteira e a amostra que dependem de diversos fatores como, por exemplo, dos materiais que compõem a amostra e a ponteira, da distância entre elas, da geometria da ponteira e de qualquer tipo de contaminação que houver sobre a superfície da amostra (HERRMANN *et al*, 1997).

Inicialmente, quando a ponteira se aproxima da amostra, ela é atraída pela superfície, devido às forças atrativas existentes na região, como as forças de van der Waals. Esta atração aumenta até determinada distância, acima desta os átomos ficam tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir. Esta repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa à medida que a distância diminui. A força anula-se quando a distância entre os átomos é da ordem de alguns angstroms. Quando as forças se tornam positivas, podemos dizer que os átomos da ponteira e da amostra estão em contato e as forças repulsivas acabam por dominar (TUSSET e BALTHAZAR, 2010).

A técnica de AFM pode ser classificada em três modos de operação distintos: contato, não-contato e intermitente que referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a sonda e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a sonda sobre a superfície em estudo (Fig. 13). O modo contato a agulha varre a amostra mantendo a menor distância possível, na faixa das distâncias interatômicas. As forças envolvidas são forças de repulsão, sendo necessário um cuidado grande para que a agulha não danifique a amostra. A técnica de não-contato explora outros níveis de interação de força. Neste método, a força entre a sonda e a amostra é menor do que no modo contato, minimizando o contato físico sonda-amostra e conseqüentemente a deformação da amostra. Nesse modo atuam forças de longo alcance como, Van der Waals, eletrostática e força de dipolo magnético. Diferente do modo contato, que opera por meio das medidas de deflexão do *cantilever* quasi-estática, no modo não-contato o *cantilever* é colocado a vibrar próximo da sua frequência de ressonância. No modo contato intermitente o *cantilever* vibra, por intermédio de um sistema piezoelétrico, próximo a sua frequência de ressonância, a diferença entre

este modo e de não-contato, é que no modo intermitente a agulha toca levemente na amostra (HERRMANN *et al.*, 1997).

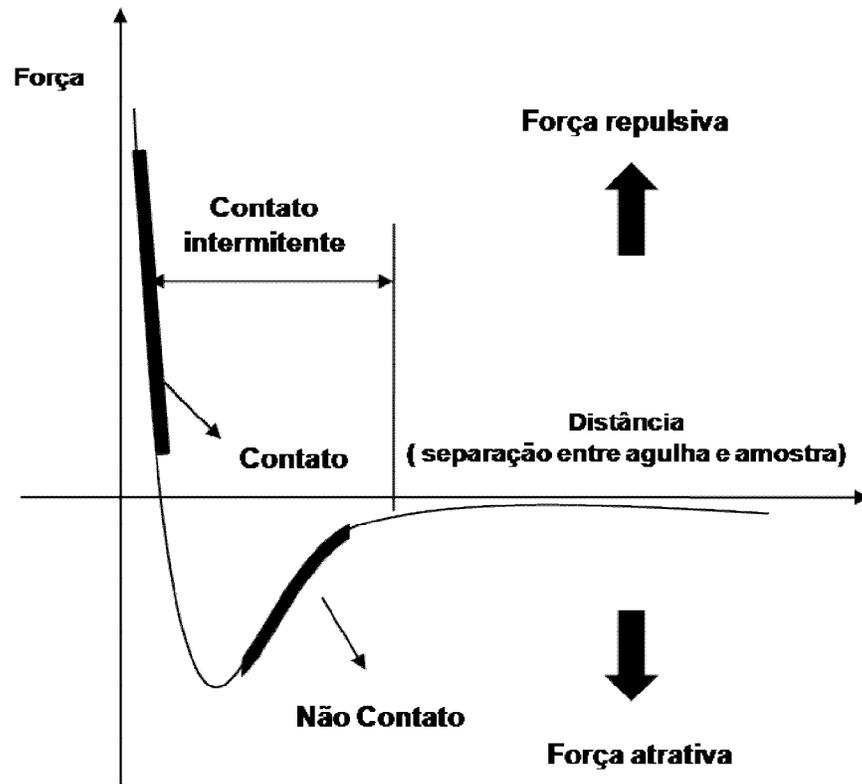


Figura 13 - Curva de força em função da distância entre a sonda e a amostra. Fonte: Herrmann *et al.*, 1997.

### 3 JUSTIFICATIVA

A detecção e identificação do *P. sclerotigenum* é de fundamental importância para o controle da contaminação por este fungo e da possível produção da patulina em alimentos. Atualmente, a detecção e identificação de fungos são realizadas basicamente através de métodos microscópicos convencionais e bioquímicos. Esses métodos possuem baixa especificidade e reprodutibilidade e demandam tempo e técnicos especializados.

Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de novos métodos e/ou produtos tecnológicos que superem as limitações das técnicas atuais. Sendo os biossensores impedimétricos um instrumento que tem condições de vir a ser uma proposta adequada de um teste rápido, confiável, sensível e simples para detecção de cepas toxigênicas de *P. sclerotigenum* em alimentos. Pois até o momento não existe no mercado genossensor disponível para detecção de fungos toxigênicos em geral. Apenas pesquisas com espécies de *Aspergillus* aflatoxigênicos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Desenvolver um biossensor impedimétrico baseado no compósito de nanopartículas de óxido de ferro e hidrocloreto de poli(alilamina) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA) para detecção de cepa toxigênica de *Penicillium sclerotigenum*.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar os parâmetros físico-químicos do oligonucleotídeo (*primer*), o qual será utilizado como molécula padrão;
- Avaliar as características eletroquímicas da interação do *primer* com o sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA;
- Estudar as propriedades interfaciais do sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-*primer*, bem como avaliação da bioatividade deste sistema frente aos genomas do *P. sclerotigenum* e do inhame contaminado com *P. sclerotigenum*;
- Análisar a morfologia e estrutura dos filmes de HPA, HPA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -*primer* e HPA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -*primer*-sequência complementar por microscopia de força atômica,;
- Determinar a capacitância da dupla camada elétrica ( $C_{dl}$ ) através de cálculos teóricos a partir de resultados experimentais e da resistência à transferência de carga ( $Z_{re}$ );
- Utilizar a técnica de EIE para caracterização da interação de *primer* com os genomas do *P. sclerotigenum* e do inhame contaminado com *P. sclerotigenum*.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Materiais

O  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Synth, Brazil) e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Reagen, Brazil) e  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Quimex, Brasil) foram os reagentes utilizados na preparação das nanopartículas magnéticas. O HPA foi obtido da *Sigma Chemical* (St. Louis, USA). Todos os reagentes e solventes usados foram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional. A água ultra pura obtida após um tratamento Milli-Q plus (Billerica, USA). O primer específico e as sequências do genoma complementar e do genoma não-complementar do *P. sclerotigenum* foram fornecidas pela Dra. Idjane Santana de Oliveira, pesquisadora do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (Centro Acadêmico de Vitória). A sequência específica do primer *idh1* utilizado no estudo foi: 5' CAATGTGTCGTACTGTGCCC- 3'.

### 5.2 Extração do DNA do *Penicillium sclerotigenum* e do inhame com podridão verde

O DNA do *Penicillium sclerotigenum* e do inhame contaminado com o fungo como genoma complementar e o primer *idh 1* foram utilizadas como amostras e sistema de reconhecimento, respectivamente. Culturas puras de um isolado de *Penicillium sclerotigenum* foram crescidas em meio líquido CY e posteriormente obtido o micélio. O DNA genômico foi extraído 0,1g de micélio do fungo, utilizando o Kit *AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep* (Axygen, USA). O mesmo kit foi empregado para extrair o DNA genômico de inhame naturalmente contaminado com *P. sclerotigenum*, para isso 0,2g de fragmento de inhame com podridão-verde foram utilizados, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As amostras foram submetidas à maceração em nitrogênio líquido para obter um pó antes da extração do DNA. A amostra controle negativo de DNA foi inhame sem contaminação (genoma não-complementar).

### 5.3 Preparação das Nanopartículas Magnéticas

As NPsFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foram preparadas via método de co-precipitação. Primeiramente, um volume igual (200 mL) de soluções aquosas de 0,1 M FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O e 0,5 M FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foram preparadas com água deionizada e transferidas para um balão de três bocas de fundo redondo e mantido sob agitação vigorosa em atmosfera de nitrogênio por 30 min até alcançar pH de 1,7. Posteriormente, uma pequena quantidade de uma solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH de 1,5 M foi progressivamente adicionado ao balão até tornar-se escura e o pH aumentar para 8. O sistema foi então agitado durante 12 horas, resultando em partículas magnéticas que por fim foram separadas por um campo magnético, centrifugação e lavadas com água deionizada (DE OLIVEIRA *et al*, 2008).

### 5.4. Preparação da matriz Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e do sistema biossensível

Inicialmente, o eletrodo de ouro foi limpo utilizando uma solução piranha. O método sol-gel foi empregado para modificar a superfície do eletrodo de ouro (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Um pequeno volume (3 mL) de uma solução de 2% p/v de HPA foi misturado com 200 µL de uma solução aquosa de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Finalmente, 2 mL dessa mistura foi depositado na superfície do eletrodo e deixado secar durante 30 minutos.

A imobilização do oligonucleotídeo foi realizada por meio da adição de 2µL do primer (495nM) sob a superfície do eletrodo modificado com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA. O processo de adsorção ocorreu por 10 min a uma temperatura de 20°C por meio de interação eletrostática entre Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA e primer. Os experimentos de hibridização ocorreram por meio da adição de 2µL de diferentes concentrações da sequência do genoma do *P. sclerotigenum* (24, 33, 49, 99 e 196 pg/µL) sob a superfície do eletrodo modificado com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-primer por 10 min a 20°C. Após os procedimentos anteriores, 2 µL de diferentes concentrações (50, 66, 100, 200 e 400 pg/µL) do genoma de inhame contaminado com *P. sclerotigenum* foram analisadas (Fig. 14).

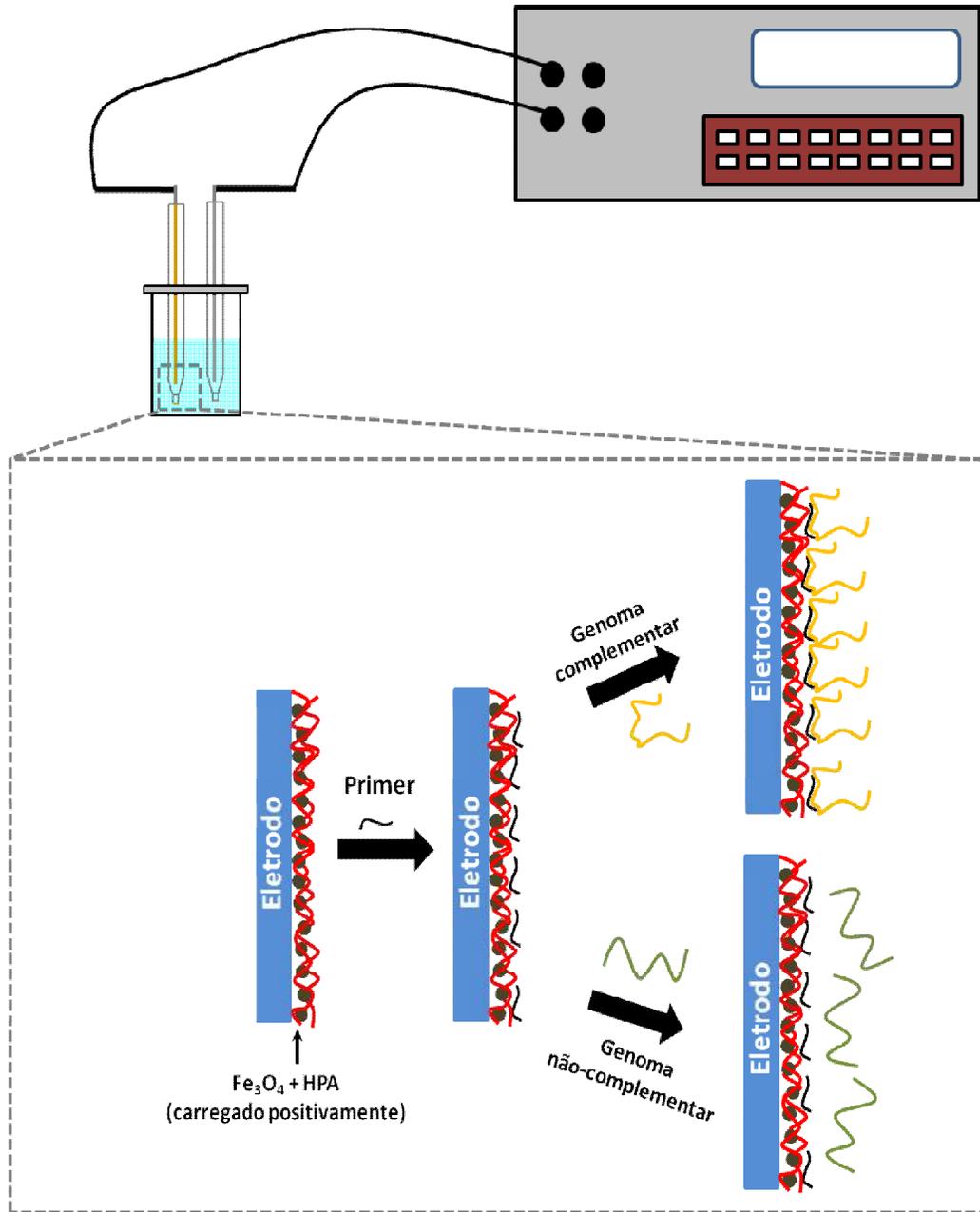


Figura 14 – Esquema do processo de fabricação do biossensor. (círculo marrom –  $NpsFe_3O_4$ ; linha vermelha – HPA; linha verde – genoma não-complementar; linha amarela – genoma complementar).

### *5.5 Medidas de espectroscopia de impedância elétrica*

As medidas de EIE foram realizadas com um analisador de impedância Solartron 1260 (AMERTK, Farnborough, United Kingdom), por meio da variação nas partes real e imaginária da impedância. O espectro de impedância foi registrado numa faixa de frequência de 0.1 Hz – 10<sup>5</sup> Hz. A amplitude do potencial de onda senoidal aplicado foi 700 mV. Foram utilizados um eletrodo de ouro modificado ( $\phi = 2$  mm) e um eletrodo de platina como eletrodo de trabalho e auxiliar, respectivamente, durante todos os experimentos. As medidas de impedância foram realizadas após cada etapa de modificação do eletrodo de trabalho. Após cada medida foram obtidos os diagramas de Nyquist e Bode.

### *5.6 Simulação do circuito equivalente das análises de EIE*

Os gráficos de impedância elétrica (diagramas de Nyquist) foram submetidos à análise de dados através do programa EQUIVCRT (BOUKAMP, 1986), a partir do qual foram obtidas curvas teóricas referentes a cada sistema.

### *5.7 Medidas de Microscopia de Força Atômica*

As medidas de microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas com um microscópio comercial PicoPlus (Molecular Imaging, USA). *Cantilevers* com uma ponta de Cr-Au (NSC18, Mikromacsch,  $F_0 = 90$  KHz, constante nominal de mola = 5.5 N.m<sup>-1</sup>) foram utilizados para o modo. Foram obtidas as áreas de varredura variando de 1.0  $\mu\text{m}$  x 1.0  $\mu\text{m}$  com uma resolução de 512 x 512 pixels. Para reduzir erros de artefato, as imagens foram obtidas de pelo menos duas áreas separadas macroscopicamente de cada amostra.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Análises de EIE

EIE é uma técnica que permite a investigação da interação entre diferentes moléculas em uma determinada interface através das mudanças nas suas propriedades elétricas, como, por exemplo, capacitância e resistência. Na EIE o diâmetro do semicírculo corresponde à resistência a passagem de corrente elétrica ( $R_e$ ). Dessa forma, representando uma ferramenta útil na obtenção de informações sobre mudanças na impedância do eletrodo modificado durante o processo de fabricação do sensor.

A fig. 15a mostra o diagrama de Nyquist após a adição de HPA sob a superfície do eletrodo em diferentes tempos, no intervalo de 5 a 45 min. Podemos observar um aumento gradual da  $R_e$  sob a superfície do eletrodo. A  $R_e$  é dependente do tempo de exposição do eletrodo a solução de HPA, assim este aumento é proporcional a quantidade de material adsorvido na superfície do eletrodo. Este comportamento indica uma cinética e adsorção, por meio de uma variação do bloqueio a passagem de corrente na superfície do eletrodo. Os dados da fig. 15b demonstraram que após 30 min é possível observar um processo de saturação da resposta mensurada sob a superfície do eletrodo. Dessa forma, 30 min foi o tempo escolhido para realizar os experimentos neste trabalho.

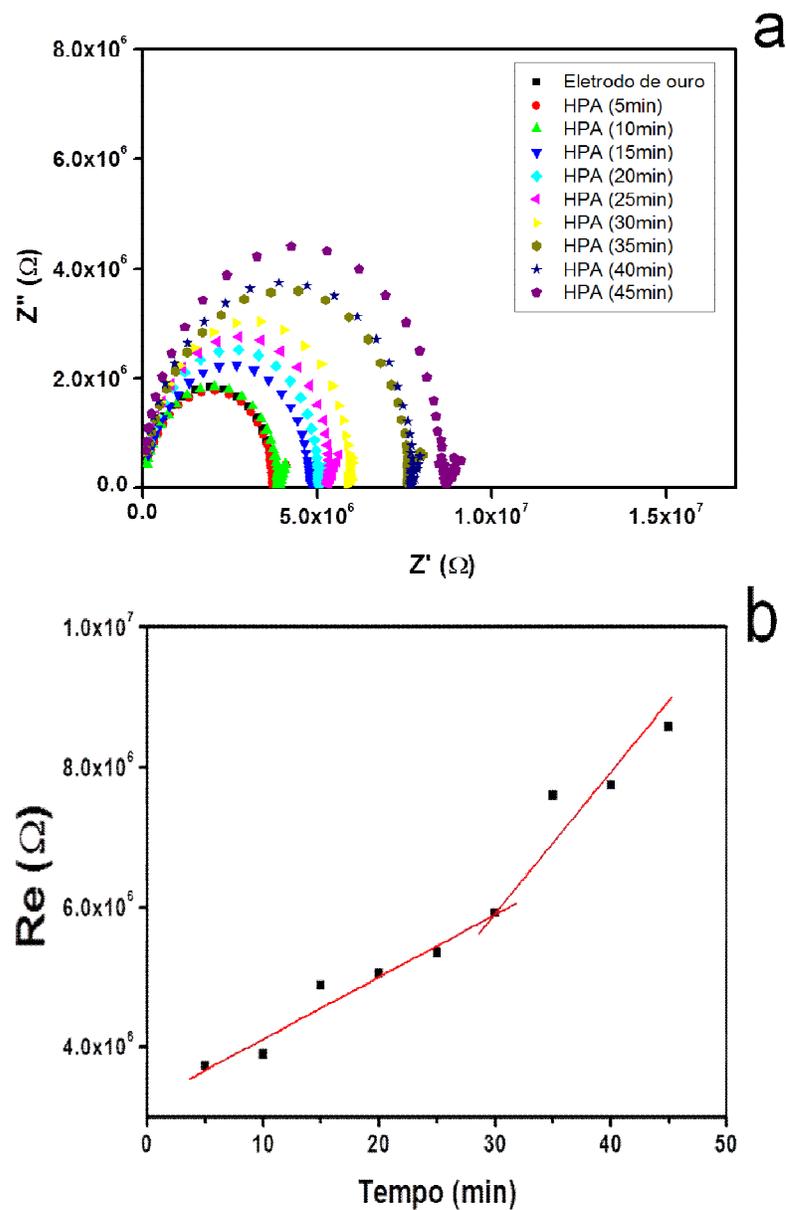


Figura 15 - Diagrama de Nyquist antes e após a adição de HPA na superfície do eletrodo de ouro em diferentes tempos (a);  $Re$  x tempo de exposição de HPA (b)

Várias concentrações de nanopartículas de  $Fe_3O_4$  (10, 15, 20, 25 e 30 mM) foram testadas. Os resultados da variação na concentração das nanopartículas para o sistema  $Fe_3O_4$ -HPA são mostrados na fig. 16a. Nessa figura, podemos observar um aumento gradual da  $R_e$  para  $Fe_3O_4$ -HPA, o qual é proporcional ao aumento da concentração de  $Fe_3O_4$ . Nos dados

apresentados na fig. 16b pode ser observado que após um aumento inicial da  $Re$  entre 10 mM e 20 mM, a curva tende ao início de platô de saturação. Assim, a concentração de  $Fe_3O_4$  utilizada nos experimentos foi 20 mM.

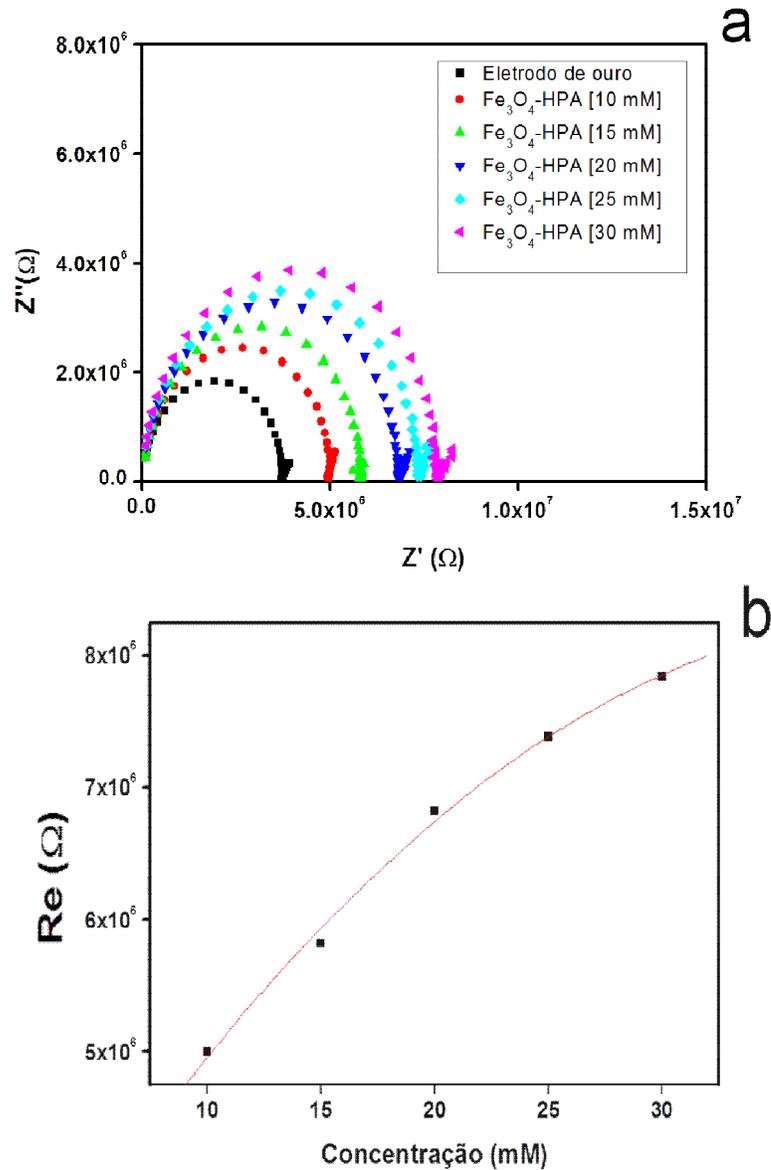


Figura 16 - Diagrama de Nyquist da variação da concentração de  $Fe_3O_4$ -HPA (a) e  $Re$  vs. concentração  $Fe_3O_4$  (b).

O *primer* foi imobilizado em diferentes intervalos de tempo variando de 5 min a 20 min (fig. 17a), sendo observado um aumento da  $R_e$  foi observado em função do tempo. Na fig. 17b é possível visualizar o desenvolvimento de

um comportamento de saturação acima de 10 min. Como consequência 10 min foi o tempo escolhido para imobilização do *primer* do *P. sclerotigenum* sob a superfície do eletrodo modificado com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA.

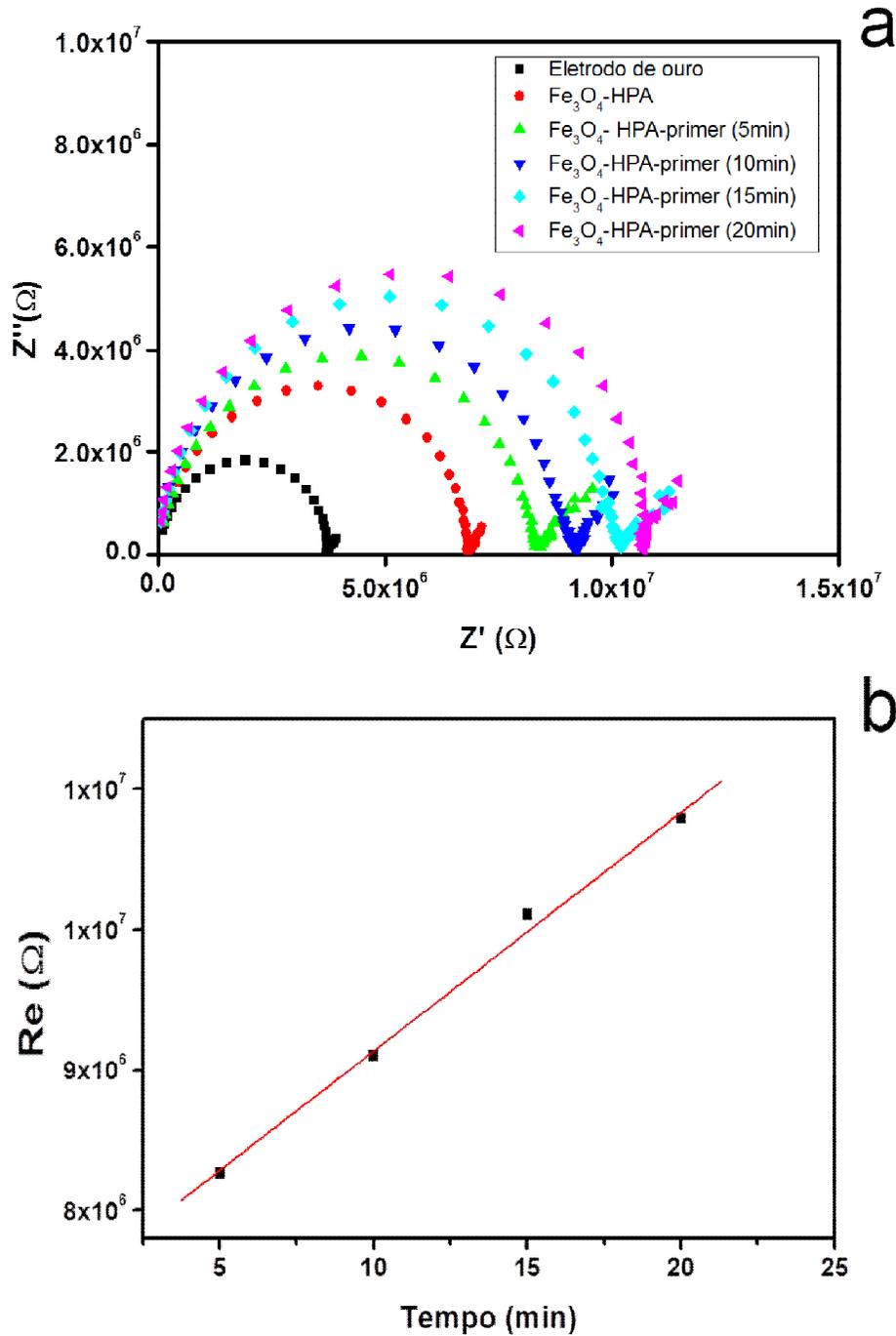


Figura 17 - Diagrama de Nyquist do eletrodo modificado com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA após a imobilização do primer em diferentes tempos (a) and Re vs. tempo de exposição do Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-primer (b).

A fig. 18a mostra o diagrama de Nyquist, após cada etapa da montagem do sensor numa faixa de frequência de 0,1 Hz – 10<sup>5</sup> Hz e amplitude de 700 mV. Na fig. 18a, a curva do eletrodo de ouro limpo mostra um pequeno semicírculo, o qual corresponde uma baixa  $R_e$  e de um processo difusional. . A adsorção do composto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA sob a superfície do eletrodo de ouro induziu um aumento no valor da  $R_e$  (6,64 x 10<sup>6</sup>Ω) quando comparado com o eletrodo de ouro limpo (3,63 x 10<sup>6</sup>Ω). A imobilização do primer sob o eletrodo de ouro modificado com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA promove um aumento adicional na  $R_e$  de 6,64 x 10<sup>6</sup>Ω para 8,90 x 10<sup>6</sup>Ω. Durante o processo de hibridação com o genoma complementar do *P. sclerotigenum* um novo aumento no valor da  $R_e$  foi observado (10,91 x 10<sup>6</sup>Ω). Esse contínuo aumento nos valores da  $R_e$  resulta de um progressivo bloqueio a passagem de corrente elétrica na interface eletrodo/solução. Este comportamento resulta da quantidade de material adsorvido na superfície do eletrodo que influencia diretamente a impedância total do sistema (OLIVEIRA *et al*, 2011). Para avaliar a seletividade do sistema biossensível desenvolvido, foi realizada análise com genoma não-complementar. A partir dos resultados obtidos foi possível observar uma resposta impedimétrica insignificante no valor de  $R_e$  após o contato do eletrodo modificado com o sistema Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-primer e o genoma não-complementar.

Como explicado anteriormente, o aumento nos valores obtidos da  $R_e$  para o sistema Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-primer-sequência complementar, estão relacionados ao bloqueio a passagem de corrente elétrica causada pela adição progressiva de moléculas sob a superfície do eletrodo. Este resultado é consistente com a hipótese de que o sistema Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-primer pode detectar eficientemente o processo de hibridação associado com o uso de um genoma complementar. De fato, valores menores de  $R_e$  obtidos para o caso do sistema Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-primer-sequência não-complementar, demonstram a especificidade do biossensor. Dessa forma, os resultados demonstram que o biossensor apresenta seletividade para sequências de DNA específicas.

Informações adicionais podem ser obtidas através da análise do gráfico de Bode (Fig. 18b). O gráfico de Bode é de grande importância para a interpretação de dados provenientes da EIE possibilitando a obtenção de informações sobre a componente capacitiva do sistema. Desta forma, podemos observar na fig. 18b que a componente capacitiva na região de média frequência é distinta para os diferentes sistemas presentes na superfície do eletrodo, o que reflete a natureza química distinta das moléculas. Além disso, em regiões de alta frequência mudanças na impedância são difíceis de serem visualizadas, entretanto nas frequências abaixo de  $10^4$  Hz essas alterações se tornam visíveis. Após a hibridação ocorre um aumento na impedância do sistema. Este comportamento é explicado por meio da redução na densidade de moléculas de água e consequentemente de íons associados com a formação da dupla hélice. Este atua como uma barreira adicional contra o descolamento de íons próximo a superfície, como consequência ocorre mudanças na impedância elétrica (GHEORGHE e GUISEPPI-ELIE, 2003; HANGA e GUISEPPI-ELIE, 2004).

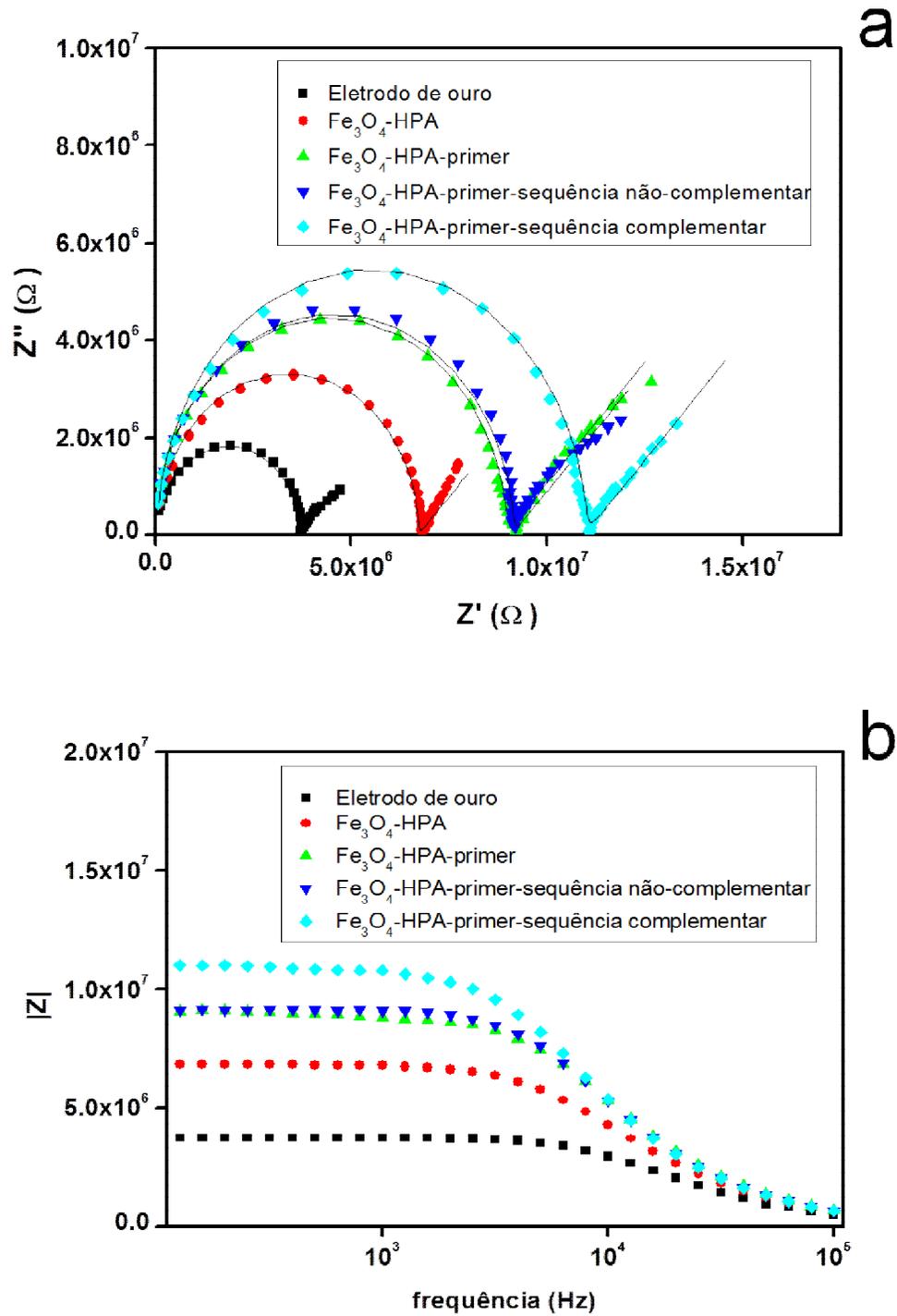


Figura 18 - Diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode (b) do processo de montagem do biossensor.

Informações detalhadas sobre o espectro de impedância podem ser obtidas por meio da análise do sistema através da utilização de circuitos equivalentes. Neste trabalho, o circuito de Randles foi escolhido para realizar o ajuste dos dados experimentais (Fig. 19). O modelo de Randles consiste na resistência ôhmica da solução ( $R_s$ ) a qual representa o efeito resistivo associado a migração de íons na solução, a impedância de Warburg ( $W$ ) resultante do transporte difusional de espécies eletroativas na superfície do eletrodo, a resistência a passagem de corrente elétrica ( $R_e$ ) e a capacitância de dupla camada elétrica ( $C_{dl}$ ).

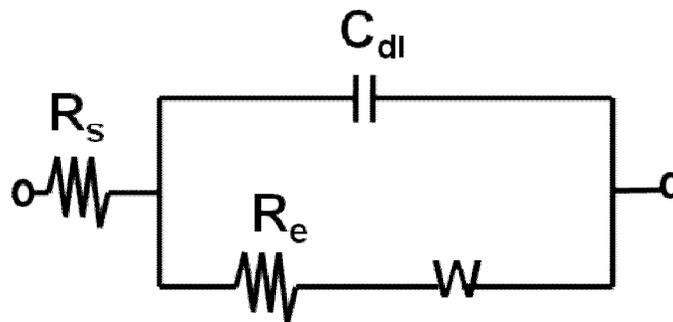


Figura 19 – Circuito equivalente adotado para o ajuste dos dados de impedância.

As respostas das curvas obtidas através do circuito equivalente apresentaram uma excelente concordância com as curvas experimentais de impedância. Os parâmetros calculados do ajuste para cada passo de formação do biossensor são apresentados na tabela 4. Como discutido anteriormente, o sucessivo aumento na  $R_e$  ao longo dos testes com  $Fe_3O_4$ -HPA,  $Fe_3O_4$ -HPA-primer e  $Fe_3O_4$ -HPA-primer-sequência complementar indicam a formação progressiva de uma camada de isolamento sob a superfície do eletrodo de ouro.

Tabela 4 – Valores dos elementos do circuito equivalente do ajuste dos resultados de impedância e da variação relativa dos dados de impedância para a passagem de corrente elétrica.

Eletrodo Modificado	$R_s (\Omega)$ ( $\times 10^3$ )	$R_e (\Omega)$ ( $\times 10^6$ )	$C_{dl} (F)$ ( $\times 10^{-12}$ )	$W (\Omega)$ ( $\times 10^{-7}$ )	$\Delta R_e (%)$
Eletrodo de ouro limpo	0,45	3,63	3,27	9,92	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA	0,74	6,64	2,69	7,06	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer	0,30	8,90	2,35	2,50	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-sequência não-complementar	0,22	9,07	2,42	2,99	1,91
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-sequência complementar (24 pg/ $\mu$ L)	0,26	9,07	2,38	2,57	1,91
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-sequência complementar (33 pg/ $\mu$ L)	0,26	9,09	2,35	2,23	2,13
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-sequência complementar (49 pg/ $\mu$ L)	0,37	9,41	2,42	2,99	5,73
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-sequência complementar (99 pg/ $\mu$ L)	0,52	10,73	2,49	2,48	20,56
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-sequência complementar (196 pg/ $\mu$ L)	0,52	10,91	2,35	4,01	22,58
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-inhame contaminado (50 pg/ $\mu$ L)	0,26	9,77	2,17	6,96	9,77
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-inhame contaminado (66 pg/ $\mu$ L)	0,38	9,93	2,19	4,04	11,57
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-inhame contaminado (100 pg/ $\mu$ L)	0,46	10,22	2,21	4,79	14,83
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-inhame contaminado (200 pg/ $\mu$ L)	0,37	10,34	2,30	8,79	16,17
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -HPA-primer-inhame contaminado (400 pg/ $\mu$ L)	0,26	10,40	2,14	4,38	16,85

A sensibilidade do sensor para o *P. sclerotigenum* foi investigada por meio da exposição do sistema para distintas concentrações da sequência complementar (Fig. 20). O espectro de impedância indica que o aumento no  $R_e$  foi diretamente proporcional a concentração da sequência complementar, demonstrando o processo de interação bioespecífico entre as fitas complementares por meio do processo de hibridação. Em adição, pode-se observar que após a obtenção do sistema Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-*primer* houve uma boa separação da resposta impedimétrica quando o sistema interagiu com o genoma específico, refletindo a manutenção das características reacionais do *primer* em estudo.

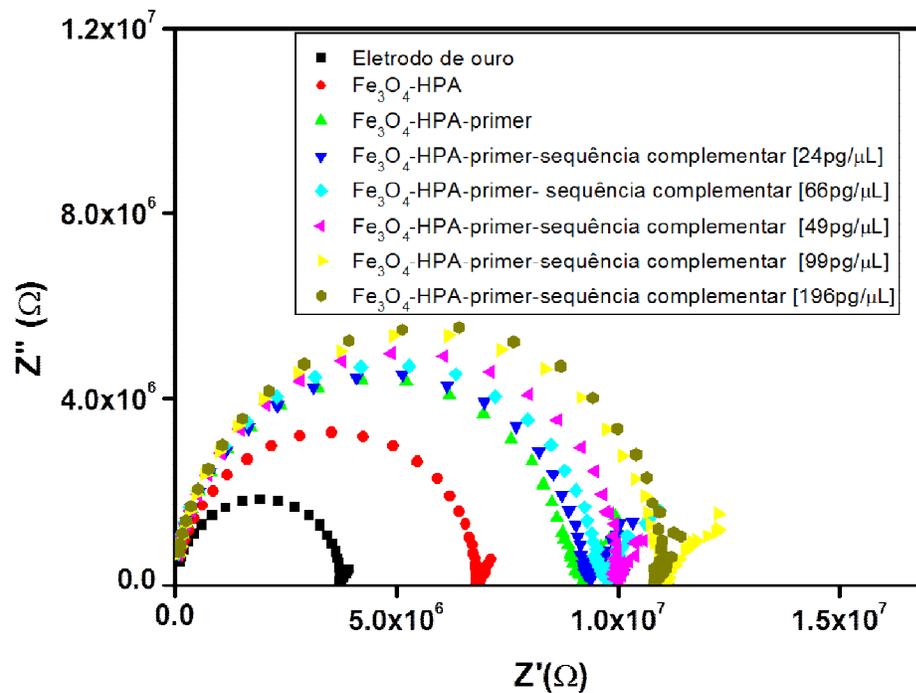


Figura 20 - Diagrama de Nyquist da variação da concentração do *P. sclerotigenum*

A performance do eletrodo de ouro modificado para detecção do genoma do *P. sclerotigenum* foi avaliada através da variação desse parâmetro ( $\Delta R_e$ ), de acordo com a seguinte fórmula,

$$\Delta R_e (\%) = \left( \frac{R_e(H) - R_e(S)}{R_e(S)} \right) \times 100$$

(4)

Em que  $R_e(S)$  é o valor da resistência a passagem de corrente elétrica do sistema ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-primer-eletrodo de ouro modificado) e  $R_e(H)$  é o valor da resistência a passagem de corrente no processo de hibridação do sistema do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-primer após a exposição a diferentes soluções contendo as sequências dos genomas complementar e não-complementar.

Os resultados correspondentes ao uso de diferentes concentrações sob a  $\Delta R_e$  durante o processo de hibridação entre o sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-primer e

a sequência do genoma complementar são mostrados na fig. 21. Foi observado um aumento sistemático do  $\Delta R_e$  entre 24 pg/ $\mu\text{L}$  e 99 pg/ $\mu\text{L}$  seguido de um platô, indicando uma relação não-linear entre o  $\Delta R_e$  e concentração do DNA. Esses resultados mostram que o processo de hibridação pode ser avaliado quantitativamente utilizando o biossistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-primer. Em adição, a alta sensibilidade do biossensor foi demonstrada por meio da utilização de pequenos volumes (2  $\mu\text{L}$ ) e baixas concentrações (pg/ $\mu\text{L}$ ) das amostras em estudo.

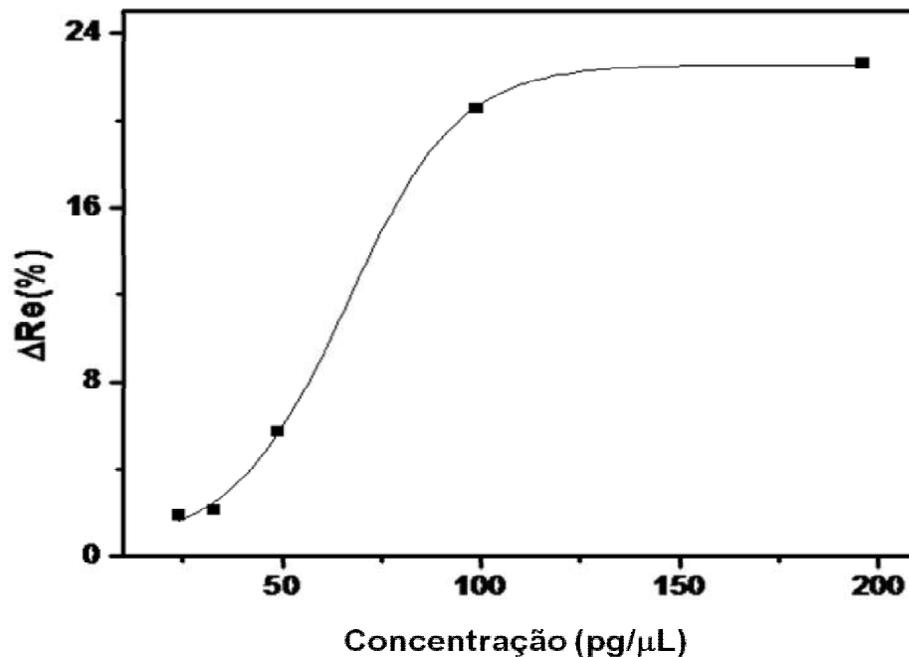


Figura 21 -  $\Delta R_e$ % vs. diferentes concentrações do genoma do *P. sclerotigenum*

Posteriormente, amostras reais obtidas de inhame contaminado com *P. sclerotigenum* foram testadas utilizando o mesmo sistema sensorial. Dos dados mostrados na fig. 22, podemos observar um aumento na  $R_e$  ( $10,40 \times 10^6 \Omega$ ) após a interação entre o eletrodo de ouro modificado com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-primer e o genoma do inhame contaminado.

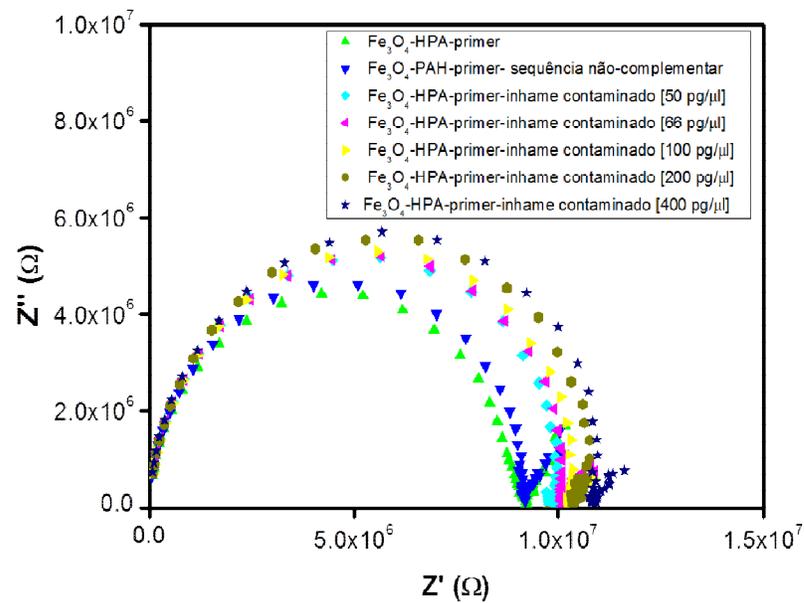


Figura 22 - Diagrama de Nyquist das soluções obtidas de inhame contaminado com *P. sclerotigenum* em diferentes concentrações.

Na fig. 23 podemos observar um aumento gradual nos valores do  $\Delta R_e$  com o aumento da concentração entre 50 e 200  $\text{pg}/\mu\text{L}$ . Portanto, esses dados indicam que o sistema proposto com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-primer é capaz de detectar a presença do *P. sclerotigenum* em alimentos.

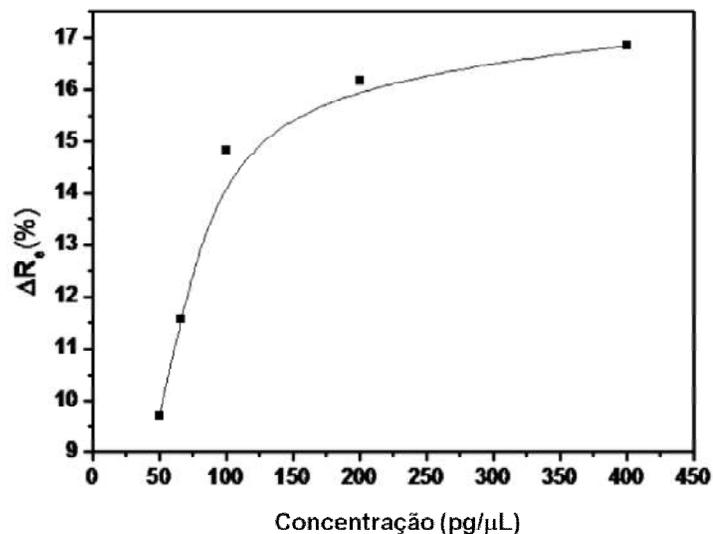


Figura 23 -  $\Delta R_e\%$  do sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-primer após o processo de hibridização com inhame contaminado com *P. sclerotigenum* em diferentes concentrações.

## 6.2 Análises Morfológicas

As análises de AFM foram realizadas para elucidar as variações do processo de modificação da superfície que influenciam na topografia e morfologia do biossensor. A morfologia da superfície do sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-*primer*-sequência complementar imobilizado sob a superfície de ouro foi estudada através de imagens de alta resolução de AFM in situ. A fig. 24a mostra filmes homogêneos de HPA com alguns agregados. O sistema HPA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é representado na fig. 24b, na qual podemos observar algumas partículas que demonstram a presença de partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Também, é possível observar alguns agregados. A fig. 24c demonstra a completa cobertura da superfície do HPA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  devido a hibridação do HPA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -*primer* com o genoma do *P. sclerotigenum*. A diferença na altura entre os diferentes sistemas HPA, HPA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , HPA- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -genoma complementar foram 16.9, 43.2 e 97.2, respectivamente.

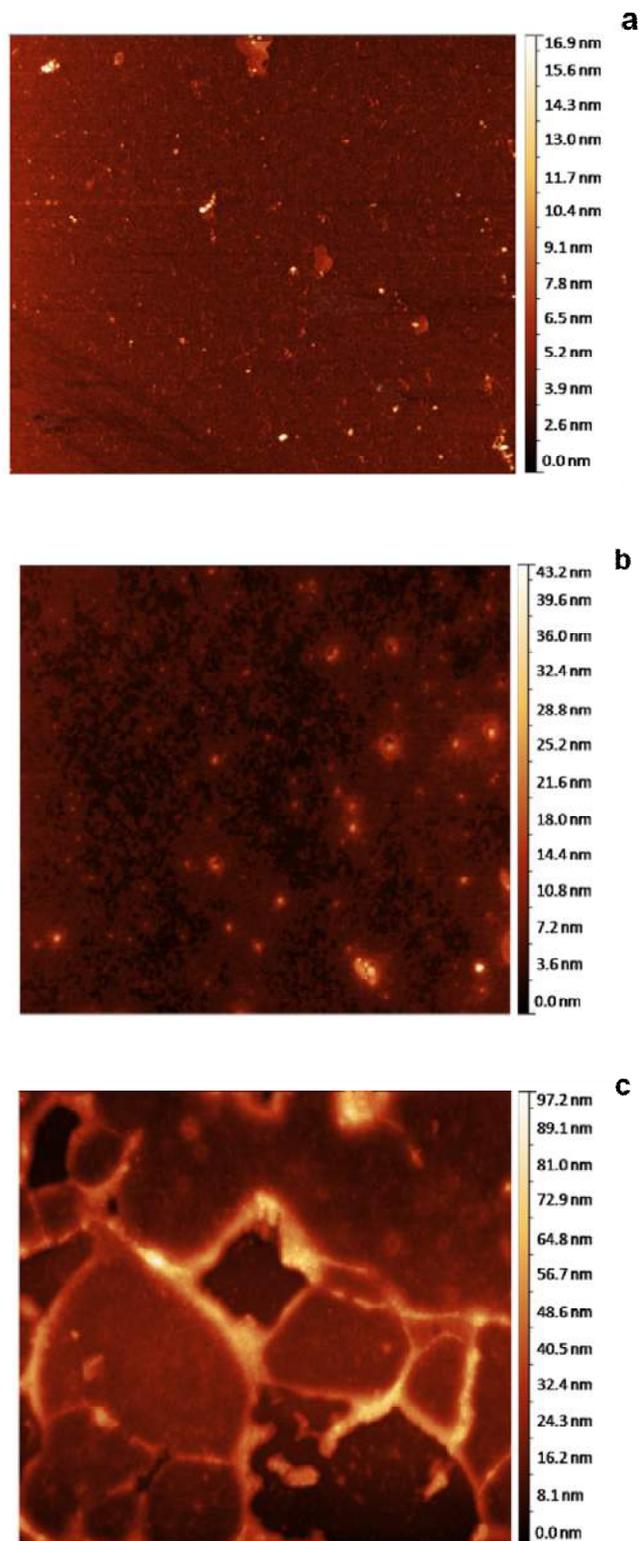


Figura 24 - Imagens topográficas da superfície do eletrodo modificado com HPA (a), HPA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (b) e HPA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-primer-genoma complementar (c).

## 7 CONCLUSÕES

- No presente trabalho foi desenvolvido um biossensor para detecção do genoma do fungo *Penicillium sclerotigenum* baseado no sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-*primer*.
- O compósito  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA possui boa biocompatibilidade, aumento da área superficial e vários sítios de ligação para imobilização de nucleotídeos mostrando ser uma boa plataforma para imobilização de biomoléculas.
- O sistema  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-*primer* demonstrou ser capaz de detectar os genomas do *P. sclerotigenum* e do inhame contaminado com *P. sclerotigenum*.
- EIE foi utilizada com sucesso para avaliar o processo de construção do biossensor, evidenciando um aumento na  $R_e$  e impedância total após cada passo da montagem do sistema.
- Através das imagens de AFM foi possível visualizar todo o processo de modificação do biossensor.
- O biossensor foi capaz de detectar qualitativamente e quantitativamente o DNA do fungo mesmo em baixas concentrações, na ordem de  $\text{pg}/\mu\text{L}$ . O sensor demonstrou boa especificidade e sensibilidade, representando uma ferramenta útil no controle de qualidade de alimentos.
- Este foi o primeiro biossensor desenvolvido de DNA desenvolvido para a detecção de fungos toxigênicos usando o gene *idh*.

## 8 PERSPECTIVAS

- Estudar o sistema proposto ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HPA-*primer*) neste trabalho para detecção do fungo em outros tipos de alimentos, como, maçã, pêra, banana, pois também são alimentos suscetíveis à contaminação pelo *P. sclerotigenum*;
- Desenvolver um biossensor para detecção da micotoxina produzida pelo fungo, a patulina, assim como outros tipos de micotoxinas, produzidos por diversos fungos.

## 9 REFERÊNCIA

ADESUYI, S. A. Curing technique for reducing the incidence of rot in yams. Nigerian Storage Products Research Institute. **Technical Report**. v. 9, p. 57-63, 1997.

ÁLVAREZ M.; CALLE, A.; TAMAYO J.; LECHUGA, L. M; ABAD, A.; MONTOYA, A. Development of nanomechanical biosensors for detection of the pesticide DDT. **Biosensors and Bioelectronics**. v.18, n.5-6, p. 649-653, 2003.

ALVES, R. M. L.; GROSSMANN, M. V. E. Parâmetros de extrusão para produção de "snacks" de farinha de cará (*Dioscorea alata*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 2, n. 1, p.32-38, 2002.

Angélica Patrícia da Silva Machado. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. 2006. 64 f. Dissertação. Minho.

ARAFAT, W, MUSA, M. N. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. **Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology**. v. 87, n. 2, p. 177-186, 1995.

BALLERSTADT, R.; EVANS, C.; MCNICHOLS, R.; GOWDA, A. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 22, n.2, p. 275-284, 2006.

BANKE, S.; FRISVAD, J. C. & ROSENDAHL, S. Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. **Mycological Research**. v.101, n. 5, p. 617- 624, 1997.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical of Microbiology Review**. v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BOONZAAIJER, G.; BODELDIJK, I.; VAN OSENBRUGGEN, W. A. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. **Food Control**. v. 16, n. 7, p. 587-591, 2005.

BOUKAMP, B. A. A package for impedance/admittance data analysis. **Solid State Ionics**. v. 18, p. 136-140, 1986.

Brasil – **Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Brasília: ANVISA, 2011.

BRETT, C. M. A. Electroanalytical Techniques for the Future: The Challenges of Miniaturization and of Real-Time Measurements. **Electroanalysis**. v. 11, n. 14, p. 1013-1016, 1999.

CÂMARA FILHO, J. C. S.; FERREIRA, N. C. M; SOARES, M. J. C. C. Aproveitamento da farinha do cará da costa na preparação de farinhas mistas panificáveis. Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA), **Boletim Técnico** nº 26. 19p. 1967.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CHANG, S. M, MURAMATSU, H; NAKAMURA, C; MIYAKE, J. The principle and applications of piezoelectric crystal sensors. **Materials Science and Engineering**. v.12, n. 1-2, p.111-123, 2000.

CHENG, T.; LIN, T.; CHANG, H. Physical adsorption of protamine for heparin assay using a quartz crystal microbalance and electrochemical impedance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**. v. 462, n. 2, p. 261-273, 2002.

CLARKE, S. M.; MCKENZIE, M. *Penicillium sclerotigenum*: a new source of griseofulvin. **Nature**. v. 213, n. 5075, p. 504-505, 1967.

COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. **Biosensor and Bioelectronics**. v. 14, n. 5, p. 443-456, 1999.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. v. 334, n. 1-2, p. 41-69, 2003.

D'SOUZA, S. F. Microbial biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 16, n. 6, p. 337-353, 2001.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**. v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

DE MELO, C. P.; PIMENTA, M.. Nanociências e nanotecnologia. **Revista Parcerias Estratégicas**. n. 18, p. 9-21, 2004.

DE OLIVEIRA H. P.; ANDRADE, C. A. S.; DE MELO, C. P. Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant-magnetite-polypyrrole particles. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 319, n. 2 p.441-449, 2008.

DEMAI, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 18, n. 1, p. 26-31, 2000.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos clínicos, preventivos e patológicos. **Biológico**. v. 64, n. 2, p. 187-191, 2002.

DONG, S.; LUO, G.; FENG, J.; LI, Q. W.; GAO, H. Immunoassay of Staphylococcal enterotoxin C 1 by Ftir spectroscopy and electrochemical gold electrode. **Eletroanalysis**. v. 13, n. 1, p. 30-33, 2001.

EDSON, G. R. F. **Imobilização de enzimas em plataformas (Sub)microestruturadas para aplicação em biossensores**. 2012. 155 f. Tese. USP. São Carlos.

ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

FEY, G. T.; LU, C.; KUMAR, T. P. Solid-state synthesis and electrochemical characterization of  $\text{LiMyCr}_{0.5-y}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$  (M = Fe or Al;  $0.0 < y < 0.4$ ) spinels. **Materials Chemistry and Physics**. v. 80, n. 1, p. 309-318, 2003.

FILHO, G. P.; PEDROSO, ENIO ROBERTO PIETRA; GIANNETTI, ALEXANDRE VARELA; DARWICH, ROGÉRIO. Aspergilose cerebral em paciente imunocompetente. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. v. 63, n. 4, p. 1094-1098, 2005.

FLEMING, M. S.; MANDAL, T.K.; WALT, D. R. Nanosphere-Microsphere Assembly: Methods for Core-Shell Materials Preparation. **Chemistry of Materials**. v. 13, n.6, p. 2210-2216, 2001.

FLOWER, P. A.; HUGHES, J. M.; ELIAS, L. M. Biocomposites: technology environmental credentials and market force. **Journal of the Science of Food and Agriculture**.v.86, n. 12, p. 1781-1789, 2006.

FONSECA, H. **Micotoxinas on line**. Disponível em: <[www.micotoxinas.com.br](http://www.micotoxinas.com.br)> Acesso em 09 de dez. 2012.

FRANK, L. A., PETUNIN, A. I. VYSOTSKI, E. S. Bioluminescent immunoassay of thyrotropin and thyroxine using obelin as a label. **Analytical Biochemistry**. v. 325, n. 2, p. 240-246, 2004.

FRISVAD, J. C; FILTENBORG, O. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: Samson, R.A. & Pitt, J.I. (eds.) **Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Plenum Press, New York, USA. 373-384. 1990.

FRISVAD, J. C; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O. & SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In: Samson, R.A. & Frisvad, J. C., (eds.) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. **Studies in Mycology**. n. 49, p. 201-242. 2004.

FUNGARO, M. H. P.. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 14, p. 12-16, 2000.

GANGOPADHYAY, R.; DE, A. Conducting Polymer Nanocomposites: A Brief Overview. **Chemistry of Materials**. v. 12, n. 3, p. 608-622, 2000.

GARCÍA, R.; PÉREZ, R. Dynamic atomic force microscopy methods, **Surface Science Reports**. v. 47, p. 197-301, 2002.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T. YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. **Química Nova**. v. 22, n. 6, p. 874-881, 1999.

GILMAN, J. W.; JACKSON, C.L.; MORGAN, ALEXANDER B.; HARRIS, R. JR. Flammability Properties of Polymer-Layered-Silicate Nanocomposites. Polypropylene and Polystyrene Nanocomposites. **Chemistry of Materials**. v. 12, n. 7, p. 1866-1873, 2000.

GUBIN, S. P.; KOKSHAROV, Y. A.; KHOMUTOV, G. B.; YURKOV, G. Y. Magnetic nanoparticles: Preparation methods, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**. v. 74, n. 6, p. 439-520, 2005.

GUISEPPI-ELIE, A.; GHEORGE, M. Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, n. 2, p. 95-102, 2003.

HALL, R. H. Biosensor technologies for detecting microbiological foodborne hazards. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 425-432, 2002.

HANGA, T. C., GUISEPPI-ELIE, A. Frequency dependent and surface characterization of DNA immobilization and hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, n.11, p. 1537-1548, 2004.

HERRERA, O. M. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei***: um enfoque de cadeia produtiva. 192 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP. São Paulo, 2001.

HERRMANN, P. S. P.; DA SILVA, M. A. P.; FO, R. B.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. p. 51-61,1997.

HERVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISCHER, Bruce. **Microbiologia Ilustrada**. 2 ed. Artmed. Porto Alegre, 2008.

HOPKINS, J. The toxicological hazards of patulin. **Food and Chemical Toxicology**. Oxford, v. 31, n. 6, p. 455-459, 1993.

HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy**, Park Scientific Instruments, 1996.

HSIUE, G. H.; LIU, YING L.; LIAO, H. H. Flame-Retardant Epoxy Resins: An Approach from Organic-Inorganic Hybrid Nanocomposites. **Journal of Polymer Science**. v. 39, n 7, p 986-996, 2001.

INTERNATIONAL MYCOLOGY ASSOCIATION (IMA), **Classification of the *Penicillium sclerotigenum***. Disponível em: < [ww.mycobank.org](http://www.mycobank.org)>. Acesso em 19 de jun. 2012.

JIANG, H.; KAKKAR, A. K. An Alternative Route Based on Acid-Base Hydrolytic Chemistry to NLO Active Organic-Inorganic Hybrid Materials for Second-Order Nonlinear Optics. **Journal of the American Chemistry Society**. v. 121, n. 15, p. 3657-3665, 1999.

JIMÉNEZ, C.; LEÓN, D. E. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**. v. 16, n. 1, p. 144-154, 2009.

JOSHI, B. K.; WICKLOW, D. T.; DOMD, P. F. Sclerotigenin: A new antiinsectan benzodiazepine from the sclerotia of *Penicillium sclerotigenum*. **Journal of Natural Products**. v. 62, n. 2, p. 650-652. 1999.

KAPPEL, N. D.; PROLL, F.; GAUGLITZ, G. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 22, n. 9-10, p. 2295-2300, 2007.

KATZ, E.; WILLNER, L. Probing biomolecules interactions of conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA – sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**. v. 15, n. 11, p. 913-947, 2003.

KAUFLMAN, L.; STANDARD, P. C. Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. **Annual Review of Microbiology**. v. 41, p. 209-225, 1987.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. Campinas, SP, p. 95 2004.

KREJCOVA, L.; HYNEK, D.; ADAM, V.; HUBALEK, J.; KIZEK, R. Electrochemical Sensors and Biosensors for Influenza Detection. **International Journal Electrochemical Science**. v. 7, n. 11, p. 10779-10801, 2012.

KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. **Mycotoxin research and mycoflora in somecommercially important agricultural commodities**. Crop Protection. v. 27, p. 891-905, 2008.

LAWLOR, P. G.; LINCH, P. B. Mycotoxins in pig feed 2: clinical aspects. **Irish Veterinary Journal**. v. 54, n. 4, p. 172-176, 2001.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba. Ed. do Autor. 140 p. 1993.

LEMONS, JUDITH LILIANA SOLÓRZANO *ET AL.* **Fungos Filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)**/- Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 58p (Série Tecnologia Ambiental, 46).

**LOS HONGOS IMPERFECTOS DEUTEROMYCETES**. Disponível em: <[www.asturnatura.com/articulos/hongos/deuteromycetes.php](http://www.asturnatura.com/articulos/hongos/deuteromycetes.php)>. Acesso em 05 de jun. 2012.

MACDONALD JR. **Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems**. Wiley, New York. 1987.

MARAGOS, C. M.; BUSMAN, M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. **Food Additives and Contaminants**. v. 27, n. 5, p. 688-700, 2010.

MARTINS JUNIOR, R. R. **Eletroquímica acoplada à ressonância de plâsmos de superfície no estudo da adsorção de proteína em filme fino**. 2007. 196 f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

MEIRELLES, P. G.; BIAZON, L.; ONO, M. A.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. YURIE S. Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**.v. 27, n. 4, p. 617-628, 2006.

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

MESQUITA, A. S. Inhame na Bahia - A produção no caminho da competitividade. In: **Inhame e Taro. Sistemas de produção familiar**. CARMO, C. A. S. (ed.) INCAPER, Vitória, Espírito Santo. 279 p. 2002.

MIURA, S.; HASUMI, K.; ENDO, A. Inhibition of protein prenylation by patulin. **Federation of European Biochemical Societies**. v. 318, n. 1, p. 88-90, 1993.

MOAKE, M. M.; PADILLA-ZAKOUR, O.; WOROBO, R. W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 4, n. 1, p. 8-21, 2005.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde** - volume 4. Organização: Etélcia Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2010. 290 p. ISBN: 978-85-98768-41-0.

MOULE, Y.; HATEY, F. Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *Byssoschlamys nivea*. **FEBS Letters**. v. 74, n. 1, p. 121-125, 1977.

MOURA, R. M. **Doenças do Inhame-da-costa (*Dioscorea cayennensis*)**. In: Kimati, H., Amorim, L., Resende, J.A.M., Bergamim Filho, A. & Camargo,

L.F.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo SP. Editora Ceres. 2005.

MOURA, R. M., RIBEIRO, G. P., COELHO, R. S. B., SILVA E JUNIOR, J.N. *Penicillium sclerogenum* Yamamoto, principal fungo causador de podridão em túberas de inhame (*Dioscorea cayennensis* is Lam.) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v. 1, p. 67-78, 1976.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**. v. 7, n. 5, p. 51-65, 2006.

NETO, M. M.; MUGLIA, V.; BATISTA, M. E. P. N.; PISI, T. M.; SABER, L. T. S.; Ferraz, A. S.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J.; FIGUEIREDO, J. F. de C.. Infecção por fungos e Transplante Renal: Análise nos primeiros 500 pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v. 17, n. 3, p. 162-170, 1995.

NEWMAN, K. Review of mycotoxins as a possible cause of mare reproductive loss syndrome. In Proceedings of the First Workshop on Mare Reproductive Loss Syndrome. **Toxicological Hypotheses University of Kentuki**. p 66-68, 2003.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**. v.1002, n. 1-2, p.111-136, 2003.

NUNES, E. O. **População de fungos filamentosos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de santa catarina**. 2008. 200 f. Tese. Florianópolis.

OKIGBO, R. N. A review of biological control methods for post harvest yams (*Dioscorea* spp.) in storage in south eastern Nigeria. **Science Journal**. 1: 1-9. 2004

OLIVEIRA M. D. L.; CORREIA M. T. S.; COELHO L. C. B. B.; DINIZ F. B. Electrochemical evaluation of lectin-sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**. v. 66, n.1, p.13-9, 2008.

OLIVEIRA, I. S. **Penicillium sclerotigenum, agente etiológico da podridão-verde do inhame: patogenia, distribuição geográfica, caracterização morfofisiológica e enzimática**. 2005. 108 f. Tese. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

OLIVEIRA, I. S.; LUZ, E. D. M. N.; MOURA, R. M.; MAIA, L. C. Distribuição Geográfica e Diversidade Morfológica de Culturas de *Penicillium sclerotigenum* em Inhames no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v. 32, n. 2, p. 131-136, 2007.

OLIVEIRA, I. S.; MOURA, R. M.; LUZ, E. D. M. N.; MAIA, L. C. Patogenicidade de *Penicillium sclerotigenum* a Diferentes Frutas e Hortaliças em Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, n. 4, p. 408-410, 2006.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. S. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; SINGH, P. R.; ZENG, X. Impedimetric biosensor based on selfassembled hybrid cystein-gold nanoparticles and Cramoll lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloids and Interface Science**. v. 362, n.1, p. 194-201, 2011.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. Patologia Pós-colheita. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al. **Patologia póscolheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2006. 855 p.

PAIVA, E. C. **Estudo do processo de nucleação de cdte crescido sobre si (111) por epitaxia de paredes quentes (hwe)**. 2003. 58 f. Tese. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.

PATEL P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 21, n. 2, p. 96-115, 2002.

PATERSON, R. R. M. Primers from the isoeoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway to indicate critical control points for patulin contamination of apples. **Food Control**. v.17, n. 9, p.741-744, 2006.

PATERSON, R. R. M. The isoeoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. **Mycological Research**. v. 108, n. 12, p. 1331-1247, 2004.

PATERSON, R. R. M.; ARCHER, S.; KOZAKIEWICZ, Z.; LEA, A.; LOCKE, T.; O'GRADY, E. A gene probe for the patulin metabolic pathway with potential use in novel disease control. **Biocontrol Science and Technology**. v. 10, n. 4, p. 509-512, 2000.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to Penicillium taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**. v. 155, n.7, 507-513, 2004.

PEJCIC, BOBBY; DE MARCO, ROLAND. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. **Electrochimica Acta**. v. 51, n. 8, p. 6217-6229, 2006.

PELCZAR, M. J; REID, R; CHAM, E. C. S. **Fungos: As Leveduras**. In: Microbiologia v.1, p. 345-366. McGraw-Hill, Brasil, 1981.

PETERSON A. W, HEATON R. J, GEORGIADIS R. Kinetic control of hybridization in surface immobilized DNA monolayer films. **Journal of American Chemical Society**. v. 122, n. 32, p.7837-7838, 2000.

PIRES, SARA RAQUEL RATO. **Desenvolvimento de novos métodos analíticos para controle da qualidade de alimentos - análise de micotoxinas**. 2009. 56 f. Dissertação. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

PUEL O, GALTIER P, OSWALD IP. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**. v. 2, n. 4, p. 613-131, 2010.

RAHAIE, M.; KAZEMI, S. S. Lectin-based: As powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnology**. v. 9, n. 4, p. 428-443, 2010.

ROGERS, K. R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**. v. 568, n. 1-2, p. 222–231, 2006.

RUMAYOR, V.G.; IGLESIAS, E.G.; GALÁN, O. R.CABEZAS, L. G. **Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria**. Fundación para el conocimiento madri+d. Informe de Vigilancia Tecnológica 119 p. 2005.

RYCHLIK, M.; SC HIEBERLE, P. Model studies on the diffusion behavior of the of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. **European Food Research and Technology**. v. 212, n. 3, 274-278, 2001.

SALKIND, A. J.; SINGH, P.; CANNONE, A.; ATWATER, T.; WANG, X.; REISNER, D. Impedance modeling of intermediate size lead–acid batteries. **Journal of Power Sources**. v. 116, n. 1-2, p.174-184, 2003.

SAMSON, R. A; SEIFERT, K. A.; KUIJPERS, A. F. A.; HOUBRAKEN, J. A. M. P. & FRISVAD, J. C. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subg. *Penicillium*

using partial  $\beta$ -tubulin sequences. In: Samson, R.A. & Frisvad, J. C., (eds) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. **Studies in Mycology**, n. 49, p. 175-200, 2004.

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea* spp.). Aspecto básico da cultura.** João Pessoa. EMEPA.1996.

SANTOS, Li. R. M. **Estudo da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica na análise dos copolímeros de enxerto.** 1994. 66 f. Dissertação. UNICAMP. Campinas.

SARTORI E. R, TAKEDA H. H., FATIBELLO-FILHO, O. Glassy Carbon Electrode Modified with Functionalized Carbon Nanotubes Within a Poly(allylamine hydrochloride) Film for the Voltammetric Determination of Sulfite in Foods. **Electroanalysis**. v. 23, n. 11, p. 2526-33, 2011.

SHARMA, S. K.; SEHGAL, N.; KUMAR, S. Biomolecules for development of biosensors and their applications. **Current Applied Physics**. v. 3, n. 2-3, p. 307-316, 2003.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminants**. v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.

SILVA. A. A. **Observações fenológicas em *Dioscorea cayennensis* Lam.** Arquivos do Instituto de Pesquisas Agronômicas v. 5, p.117-191, 1965.

SLUYTERS-REHBECH, M. Impedances of electrochemical systems: terminology, nomenclature and representation. **Pure Applied Chemistry**. v. 66, n. 9, p. 1831-1891, 1994.

SNEVAJSOVA P.; TISON, L.; BROZKOVA, I.; VYTRASOVA, J.; METELKA R.; VYTRAS K. Carbon paste electrode for voltammetric detection of a specific

DNA sequence from potentially aflatoxigenic *Aspergillus* species. **Electrochemistry Communications**. v. 12, n.1, p. 106–109, 2010.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**. v. 20, n. 2, p. 191-197, 1997.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TANIWAKI, M.; HANADA, T.; SAKURAI, N. Device for acoustic measurement of food texture using a piezoelectric sensor. **Food Research International**. v.39, n. 10, p. 1099-1105, 2006.

TANIWAKI, M.; SILVA, N. **Microbiologia: fungos deteriorantes em alimentos**. Campinas: editora, 2001.

TEDESCHI, L.; DOMENICI, C., AHLUWALIA, A.; BALDINI, F.; MENCAGLIA, A. Antibody immobilisation on fibre optic TIRF sensors. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, n. 2, p. 85-89, 2003.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p. ISBN 8573796812 (broch.).

TSUI, C. K. M.; WOODHALL, J.; CHEN, W.; LÉVESQUE, C. A.; LAU, A.; SCHOEN, C. D.; BASCHIEN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. **IMA Fungus**. v. 2, n. 2, p. 177-189, 2011.

TUSSET, A. M; BALTHAZAR, J. M. **Microscopia de força atômica: controle de uma microviga modelada matematicamente com comportamento não-linear e sob ação de amortecimento hidrodinâmico**. Proceedings of

the 9th Brazilian Conference on Dynamics Control and their Applications. ISSN: 2178-3667 p.363-370 Serra Negra, SP.

VÄLIMAA, A.; KIVISTÖ, A. T.; LESKINEN, P. I.; KARP, M.. A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk. **Journal of Microbiological Methods**. v. 80, n. 1, p.44-48, 2010.

VELASCO-GARCIA, M.N.; MOTTRAM, T. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. **Biosystems Engineering**. v. 84, n.1, p. 1-12, 2003.

WANG, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **Analyst**. v. 130, n. 4, p. 421-426, 2005.

WANG, L.; SUN, Y.; WANG, J., WANG, J.; YU, A.; ZHANG, H.; Song, D. Water-soluble ZnO–Au nanocomposite-based probe for enhanced protein detection in a SPR biosensor system. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 351, n. 2, p. 392-397, 2010.

WANG, Q.; LI, N.. Electrocatalytic response of norepinephrine at a thiolactic acid selfassembled gold electrode. **Talanta**. v. 55, n. 6, p. 1219-1225, 2001.

WENGENACK NL, B. M. Fungal molecular diagnostics. **Clinics In Chest Medicine**. v. 30, n. 2, p. 391-40, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO. Forty-fourth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Geneva: Technical Report Series 859, p. 36-38, 1995.

XIAN, Y.; HU, Y.; LIU, F.; XIAN, Y.; WANG, H.; JIN, L. Glucose biosensor based on Au nanoparticles conductive polyaniline nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 21, n. 10, p. 1996-2000, 2006.

YAMAMOTO, W.; YOSHITANI, K.; MAEDA, M. Studies on the *Penicillium* and *Fusarium* rots of chinese yam and their control. **The science reports of the Hyogo University of Agriculture**. v. 2, n. 1, p. 69-79, 1955.

ZHOU, W.; HOLZHAUER-RIEGER, K.; DORS, M.; SCHIIGERL, K. Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain *Cephalosporium acremonium*. **Journal of Biotechnology**. v. 23, n. 3, p. 315-329, 1992.

**APÊNDICE** – Carta de aceite e artigo aceito para publicação na revista Journal of Colloid & Interface Science

Ms. No.: JCIS-12-3041R1

Title: IMPEDIMETRIC SENSOR FOR TOXIGENIC PENICILLIUM SCLEROTIGENUM DETECTION IN YAM BASED ON Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-POLY(ALLYLAMINE HYDROCHLORIDE) COMPOSITE

Corresponding Author: Dr Maria Danielly Lima de Oliveira

Authors: Gilcelia J Silva, BSc; Cesar A ANDRADE, PhD; Idjane S Oliveira, PhD; Celso P de Melo, PhD;

Dear Dr de Oliveira,

I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for Publication in the Journal of Colloid & Interface Science.

Proofs of the article will be sent to you in the near future.

Many thanks for submitting your manuscript to the Journal of Colloid & Interface Science. We hope that you have been pleased with the handling of your manuscript, and that you will consider submitting other quality manuscripts in the future. For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/5 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

With kind regards,  
The Editors

Journal of Colloid and Interface Science  
Editorial Office  
Elsevier  
525 B Street, Suite 1900  
San Diego, CA 92101-4495  
USA  
Phone: (619) 699-6397  
Fax: (619) 699-6855  
E-mail: jcis@elsevier.com

Journal of Colloid and Interface Science  
  
Editorial Office  
  
Elsevier  
  
525 B Street, Suite 1900  
  
San Diego, CA 92101-4495  
  
USA  
  
Phone: (619) 699-6397  
  
Fax: (619) 699-6855  
  
E-mail: jcis@elsevier.com

#### Elsevier Colloids Club

Elsevier has created an electronic subscription to 5 leading journals in Colloid & Interface Science for just \$99.95. For this you will receive online access to the current year and the two previous subscription years of these journals.

This special offer is for accepted Authors - all you need to do is to go to the site: [https://enduser.elsevier.com/colloids\\_club](https://enduser.elsevier.com/colloids_club), register and pay with your credit card, a quick and easy process, and completely online.

IMPEDIMETRIC SENSOR FOR TOXIGENIC *PENICILLIUM SCLEROTIGENUM*  
DETECTION IN YAM BASED ON Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-POLY(ALLYLAMINE HYDROCHLORIDE)  
COMPOSITE

Gilcelia, J.L. Silva<sup>1</sup>, Cesar A.S. Andrade<sup>1,2</sup>, Idjane S. Oliveira<sup>3</sup>,

Celso P. de Melo<sup>4</sup>, Maria D.L. Oliveira<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil*

<sup>2</sup>*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil*

<sup>3</sup>*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil*

<sup>4</sup>*Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil*

\*To whom correspondence should be addressed.

M.D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m\_danielly@yahoo.com.br

**Abstract**

We describe a new DNA biosensor for the detection of toxigenic *Penicillium sclerotigenum* in pure culture or infected yams. The *P. sclerotigenum* detection takes place on a self-assembled monolayer of a (magnetite)/(poly(allylamine hydrochloride)) (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH) composite that serves as an anchoring layer for the DNA hybridization interaction. Electrical impedance spectroscopy (EIS) was used to evaluate and quantify the hybridization degree. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH composite is a good platform for the immobilization of biomolecules, due to the presence of many possible binding sites for nucleotides and to its large surface-to-volume ratio and good biocompatibility. The biosensor was capable of not only qualitatively detecting the presence of the fungus genome at low concentrations, but also shown a good quantitative impedimetric response its electrical resistance was monitored along the time of exposure. A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH-probe biosensor would require only small volumes and low concentrations of the analyte when used, for instance, in detecting *P. sclerotigenum* contamination of food, besides presenting many comparative advantages, such as selectivity, specificity and reproducibility, relative to alternative techniques.

Keywords: impedance spectroscopy; biosensor; magnetic nanoparticles; composite; *Penicillium sclerotigenum*.

## 1. Introduction

Biosensors are analytical devices used for direct measurement of a given substance in complex biological samples. Electrical biosensors are important class of these sensors in which an electrode is used as the transduction element. For them, the principle of detection is based on the specific binding of the analyte to the biomolecule immobilized on a solid support [1], producing an electrical signal proportional to the concentration of the analyte.

At present, there is a keen interest in biosensor technology due to its large potential for applications in many fields, such as drug research, disease diagnosis, environmental control and food technology [2-5]. Genosensors are biosensors that combine a single-stranded DNA (ssDNA) – the DNA probe – with a transducer to detect a specific genome. DNA biosensors present several advantages such as low cost, rapid analysis, simplicity and possibility of miniaturization. Currently, when compared to conventional methods, DNA biosensor is a useful tool for the diagnosis of diseases and detection of toxigenic fungi in food [6, 7].

Classical methods for detection and identification of fungi in food are based on either cultures in different media or microscopic and biochemical analysis. However, usually these classical methods not only have low specificity and lack reproducibility, but they are also time-consuming and require the involvement of experienced technicians [8]. Hence, there is a current trend in using molecular techniques, such as PCR and fluorescence *in situ* hybridization, to detect and recognize if fungi are present. Although such methods are fast and have good specificity, they still demand high technological support and qualified personnel [9]. DNA array technology, another promising method for detection of fungi is still expensive and time-consuming [10].

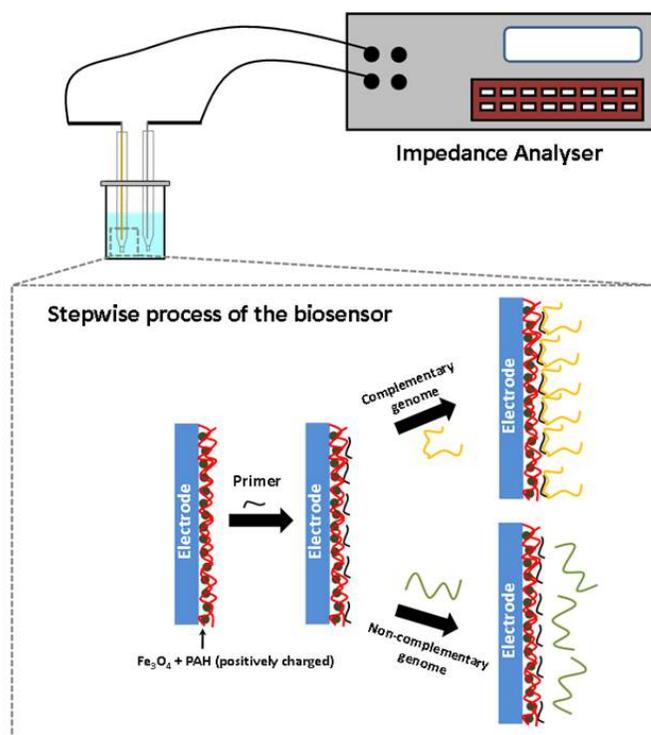
Among the many alternative techniques that have been used to the development of DNA biosensors, electrical impedance spectroscopy (EIS) stands out. As a simple, sensitive, low cost and useful method to monitor the interfacial properties of a modified surface, this

technique is very well suited for the development of DNA biosensors [11, 12]. The EIS operating principle is the analysis of the response of the sample of interest to an electrical stimulus selectively applied to it. The stimulus consists in submitting the system to a continuous sinusoidal potential of small amplitude [13-15]. The immobilization of the DNA at the electrode surface and corresponding recognition events result in changes in the capacitance and interfacial electron transfer resistance of the sample [16, 17].

*Penicillium sclerotigenum* is a phytopathogenic and toxigenic fungi responsible for high losses in the production of yams for causing the postharvest green rot disease. Yam green rot is a common problem in Nigeria (Tropical Africa) and Brazil (South America), important yam export-producing countries. In addition, this fungus also produces the mycotoxin patulin [18, 19]. Patulin (Ptn) is a mycotoxin that represents a problem in food industry and public health because of its mutagenic, neurotoxic and immunotoxic properties that include genotoxic effects. About 10 biochemical reactions associated to 15 enzymes and production of other co-metabolites are involved in the biosynthetic pathway of Ptn [20], where one of the key steps is the conversion of isopoxycon to phyllostine catalyzed by isoepoxydon dehydrogenase (IDH). The *idh* gene encodes the enzyme isoepoxydon dehydrogenase and the presence of this gene in fungi has been correlated to patulin production [21]. Therefore, the *idh* gene can be used in the screening of the presence of this toxigenic fungus and in the development of new devices for patulin detection.

In this paper we describe the development of an impedimetric biosensor based on magnetite/(poly(allylamine hydrochloride)) – hereafter Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH – composite for detection of *idh* as a probe of the presence of toxigenic *P. sclerotigenum* in yam (Fig. 1). While use of new materials can contribute to improve the electrical response of a given biosensor, due to their properties of biocompatibility and large surface-to-volume ratio [22], magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles have been extensively used in immobilizing biomolecules. The use of

superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) in a biosensor has the advantage of high magnetic susceptibility and good dispersibility (not form cluster as long as no magnetic field is applied) [23]. SPION has also been covered with gold (an external inert shell) in order to add new properties (inertness, protection of the magnetic core against oxidation), without modifying their superparamagnetic behavior [24]. Mirkin group has developed a bio-bar code assay for detection of genomic DNA based on the use of magnetic particles for molecule isolation/purification and the oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as recognition agents [25]. Poly(allylamine hydrochloride) (PAH) is a cationic polyelectrolyte with many ionizable amine groups in its structure, which is fully protonated in neutral and acid solutions, but partially deprotonated in slightly basic solutions [26]. To the best of our knowledge, we have shown for the first time the development of an electrochemical biosensor for detecting toxigenic *Penicillium sclerotigenum* in yam.



&lt;&lt; Fig. 1 &gt;&gt;

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Synth, Brazil),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Reagen, Brazil) and  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Quimex, Brazil) were the reagents used in the preparation of the magnetic particles. PAH was obtained from Sigma Chemical (St. Louis, USA). All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment.

### 2.2. Extraction of DNA from *P. sclerotigenum* and Yam with green rot

The sensor layer of the detection system was based on *idh1* primer to recognize complementary target DNA of *P. sclerotigenum* and yams contaminated [21]. The primer sequence of *idh1* is 5'-CAATGTGTCGTACTGTGCCC-3'. Pure culture of one isolate of *P. sclerotigenum* was grown in liquid medium CY and after obtaining the mycelium, genomic DNA was extracted using the AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, USA), from 0.1 g of the mycelium of the fungus. The same kit was used to extract genomic DNA from naturally contaminated yam with *P. sclerotigenum*, from 0.2 g of yam fragments with green rot, following the protocol established by the manufacturer. The samples were subjected to maceration in liquid nitrogen until resulting in a powder, prior to DNA extraction. The negative control sample of DNA was Yam experiments without contamination (non complementary).

### 2.3. Preparation of magnetic nanoparticles

The magnetic nanoparticles were prepared via a previously reported co-precipitation method [27, 28]. Equal volumes (200 mL) of aqueous solutions of 0.1 M  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and 0.5

M FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O were prepared with deionized water and transferred to a three-necked round-bottom flask, maintained under intense stirring in a nitrogen atmosphere for 30 min, and then 0.45 M HCl solution diluted in deoxygenated water was mixed in until a pH of 1.7 was reached. Thereafter, small quantities of a 1.5 M aqueous solution of NH<sub>4</sub>OH were progressively added to the flask until the liquid turned blackish and the pH increased to 8. The system was then stirred for another 12 h, after which the resulting magnetic particles could be magnetically separated [28].

#### 2.4. Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA matrix and biosensing system

Initially, the bare gold electrode was cleaned using piranha solution. A sol-gel method was employed to modify the gold electrode surface [29]. A small volume (3 mL) of a 2% p/v PAH solution was mixed to 200 µL (corresponding to 20 mM) of an aqueous solution of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. Finally, 2 µL of this mixture were deposited on the electrode surface and allowed to dry for 30 minutes.

For the oligonucleotide immobilization, 2 µL of the DNA probe (495 nM) were added to the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH-modified gold electrode surface. The adsorption was then allowed to occur for 10 min at 20°C, by means of the electrostatic interaction between Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH and the DNA probe. The hybridization experiments were carried out by the addition of 2 µL of different concentrations of complementary genome sequence (24, 33, 49, 99 and 196 pg/µL) on the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH -probe-modified electrode surface for 10 min at 20°C. Following the previous procedure, a small volume (2µL) of different concentrations (50, 66, 100, 200 and 400 pg/µL) of yam's genome contaminated with *P. sclerotigenum* was also analyzed.

#### 2.5. Dielectric measurements

The EIS measurements were performed with a 1260 impedance/gain-phase analyzer (Solartron, UK) by monitoring the variation of the real and imaginary parts of the impedance in the frequency range of 0.1 Hz to  $10^5$  Hz. The amplitude of the applied sine wave potential was 10 mV. We used a bare gold electrode ( $\phi = 2$  mm) and a platinum wire as working and auxiliary electrodes, respectively. All experiments were carried out using deionized water. All measurements were performed in triplicate using at least three different sensors.

### *2.6. Atomic force microscopy characterization*

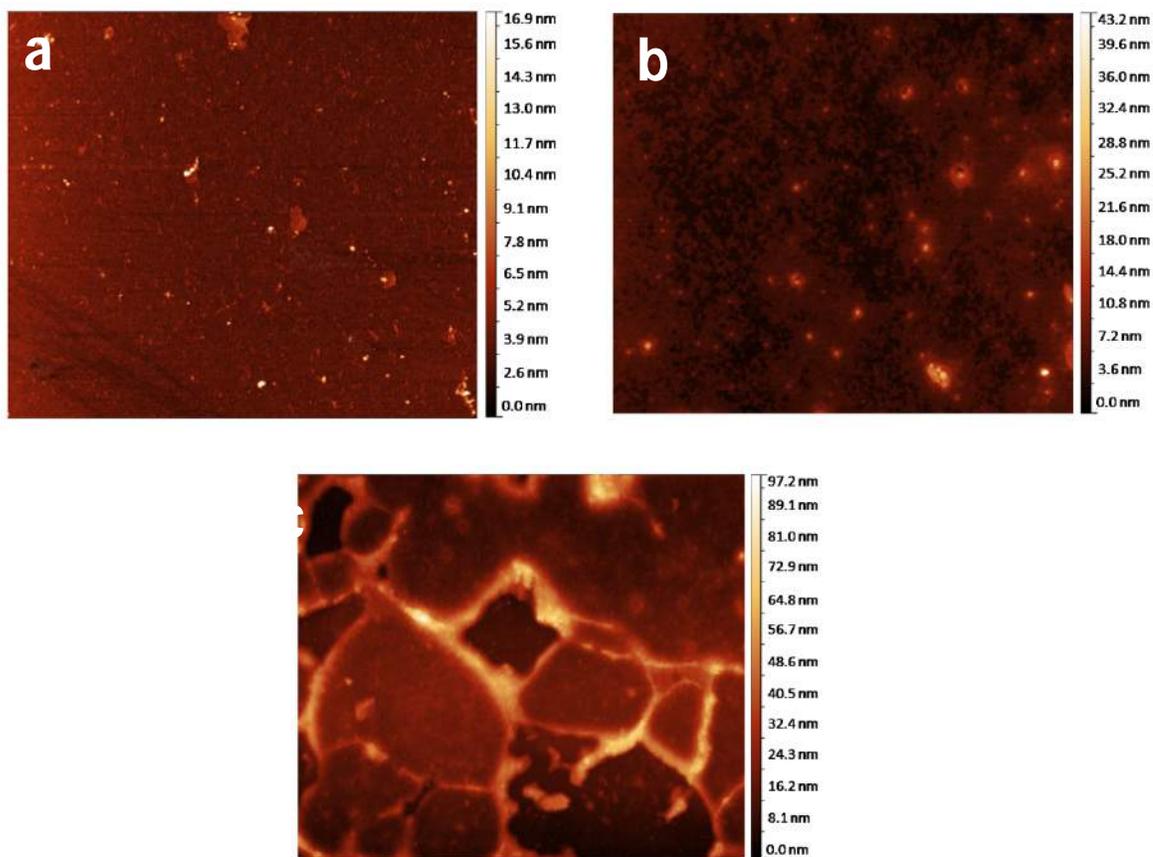
The atomic force microscopy (AFM) measurements were performed with a commercial PicoPlus microscope (Molecular Imaging, USA). Cantilevers with a Cr-Au tip (NSC18, MikroMasch,  $F_0=90$ KHz, nominal spring constant =  $5.5 \text{ N.m}^{-1}$ ) were used for the tapping mode AFM in air at room temperature (approximately  $25^\circ\text{C}$ ). Scan areas varying from  $1.0\mu\text{m}\times 1.0\mu\text{m}$  with a resolution of  $512\times 512$  pixels were obtained. To reduce artifact errors, for each sample the images were obtained from at least two macroscopically separated areas.

## **3. Results and discussion**

### *Morphological analyses*

We performed an AFM analysis to elucidate the variations of the stepwise process influencing the surface topography and morphology of the biosensor. The surface morphology of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe-complementary sequence system immobilized on gold surface was studied by high-resolution in situ AFM imaging measurements. In Fig. 2a we show homogenous film of the PAH with some aggregates, while the PAH- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  system can be seen in Fig. 2b; in this latter image we can observe some particles that demonstrate the

presence of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  particles. Also, it is possible observe some aggregates. In Fig. 2c we show a complete covering of the PAH- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  surface due to the hybridization of the PAH- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -probe with *P. sclerotigenum* genome. In addition, differences in the film roughness were obtained. The typical heights of the different PAH, PAH- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and PAH- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -probe-complementary genome systems were 16.9 nm, 43.2 nm and 97.2 nm, respectively.



<< Fig. 2 >>

### *EIS analysis*

EIS is a technique that allows the investigation of the interaction between different molecules on a given interface through the corresponding changes in its electrical properties, e.g., capacitance and resistance. For us, it became a useful tool in obtaining information about

changes in the impedance of the modified electrode during the process of fabrication of the sensor.

In Fig. S1a (see supporting information) we show the Nyquist plots after the progressive addition of PAH on the electrode surface at distinct times within a 5 min to 45 min interval. We observed a gradual increase of the resistance to the passage of electric current ( $R_e$ ) on the electrode surface. The  $R_e$  is dependent on the time of exposure of the electrode to the PAH solution and, thus, this increase is proportional to the amount of adsorbed material. In this way, one can follow the corresponding kinetics adsorption by monitoring variation in the blockage of the passage of current at the electrode surface. From the data shown in Fig. S1b, one can see that after 30 min there is already saturation of the response measured on the gold electrode surface. Thus, 30 min was chosen as the time limit to perform the experiments of this study.

Several concentrations (10, 15, 20, 25 and 30 mM) of the  $Fe_3O_4$  nanoparticles were tested. The results of the variation of the magnetic particles concentration for  $Fe_3O_4$ -PAH system are shown in Fig. S2a. We observed a gradual increment of  $R_e$  for  $Fe_3O_4$ -PAH, which is proportional to the increase of the  $Fe_3O_4$  concentration (Fig. S2a). From the data presented in Fig. S2b, it can be observed that, after an initial  $R_e$  increase between 10mM and 20mM, there begins a trend to form a saturated plateau. The  $Fe_3O_4$  concentration used for all experiments was 20mM.

The DNA probe was immobilized for different intervals of time varying from 5 min to 20 min (Fig. S3a), when a corresponding increase of the  $R_e$  was observed. From the data shown in Fig. S3b (see supporting information) it can be observed that the saturation behavior develops above 10 min. As a consequence, 10 min was the time limit chosen for the immobilization of the *P. sclerotigenum* probe on  $Fe_3O_4$ /PAH modified electrode surface.

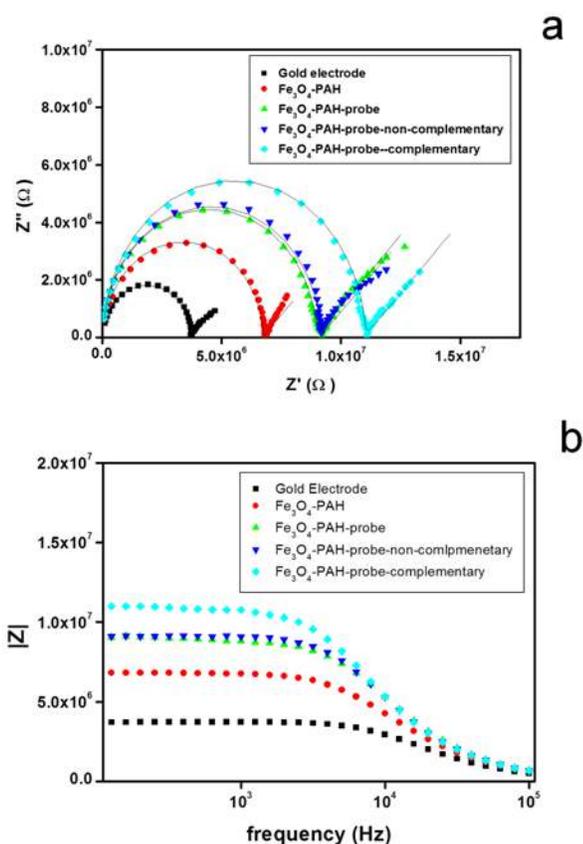
*Specificity tests*

As explained before, the highest  $R_e$  values were obtained for the  $Fe_3O_4$ -PAH-probe-complementary sequence system, that are exactly those associated to the blockage in the passage of current caused by the progressive addition of molecules to the electrode surface. This result is consistent with the hypothesis that the  $Fe_3O_4$ -PAH-probe system can effectively detect the hybridization process associated to the use of a complementary genome. In fact, lower  $R_e$  values were obtained for the case of  $Fe_3O_4$ -PAH-probe-non-complementary systems when compared to the dielectrical response of  $Fe_3O_4$ -PAH-probe-complementary ones, in a demonstration of the specificity of the biosensor (Fig. 3a). We consider that, when taken together, these results have demonstrated that our biosensor shows selectivity to specific DNA sequences.

Nyquist plots of the stepwise assembly of the sensor taken in the 1Hz to  $10^5$ Hz a frequency range, and for a sine wave potential of amplitude equal to 10 mV, are shown in Fig 3a. The curve obtained for the pure gold electrode corresponds to a small semicircle, which can be associated to a small  $R_e$  and to the occurrence of a diffusional process. The assembly of the  $Fe_3O_4$ -PAH composite atop the gold electrode surface leads to an increase in the  $R_e$  value ( $6.64 \times 10^6 \Omega$ ) as compared to that of the pure electrode ( $3.63 \times 10^6 \Omega$ ). The immobilization of the DNA probe on the  $Fe_3O_4$ -PAH-modified gold electrode promotes a further increase in the  $R_e$  value ( $8.90 \times 10^6 \Omega$ ). During the hybridization tests, when genome complementary sequence from *P. sclerotigenum* was used, a new increase in the value of  $R_e$  was observed. This continuous increase in the  $R_e$  values results from the progressive blockage of the passage of the electric current in the electrode/solution interface. Thus, the amount of adsorbed material on the electrode surface contributes directly to the total impedance of the system. In fact, a negligible contribution was observed for the dielectric response of the

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe-modified gold electrode after contact with a non-complementary DNA sequence.

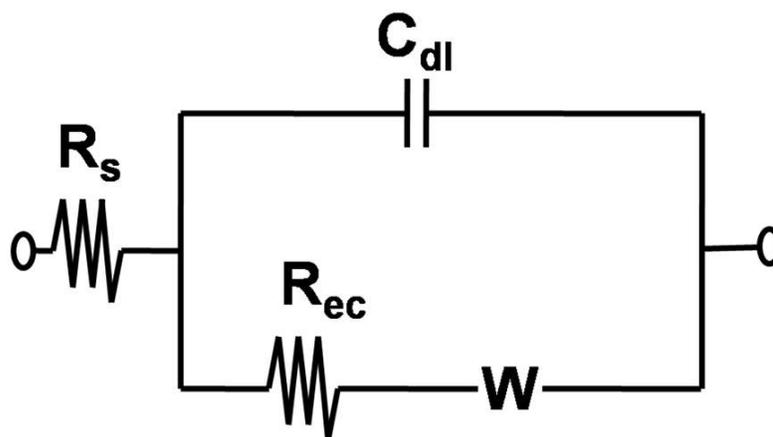
In Fig 3b we can observe that while small changes can be noticed in the impedance values at high frequencies, at lower frequencies there is a clear distinction between the impedimetric responses of the different analyzed systems. After the hybridization process, one can observe an increase in the impedance response that can be explained by the reduction in the density of water molecules. When of the adsorption of the genome on the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe-modified gold electrode, an additional barrier to the displacement of ions arises near of the surface and, as a consequence, noticeable changes occur in the electrical impedance [30].



<< Fig. 3 >>

*Simulated curves*

Detailed information about the impedimetric spectra can be obtained by analyzing the system through the use of equivalent circuits. In the present work, the Randles circuit was chosen to fit the experimental data (Fig. 4). The Randles model consists of the ohmic resistance of the solution ( $R_s$ ), which represents the resistive effect associated to the ion migration in the solution, the Warburg impedance ( $W$ ) resulting from the diffusional transport of electroactive species to an electrode surface, the resistance to the passage of electric current ( $R_e$ ) and the capacitance of the double layer ( $C_{dl}$ ).



&lt;&lt; Fig. 4 &gt;&gt;

The response curve (Fig. 3a) obtained for the equivalent circuit exhibits excellent agreement to the experimental impedance plots. The parameters calculated from the fitting for the stepwise formation of the sensor are presented in Table 1. As discussed before, the successive increase in the  $R_e$  values along the  $Fe_3O_4$ -PAH,  $Fe_3O_4$ -PAH-probe and  $Fe_3O_4$ -PAH-probe-(complementary sequence) tests indicates the progressive formation of insulating layers on the gold electrode surface.

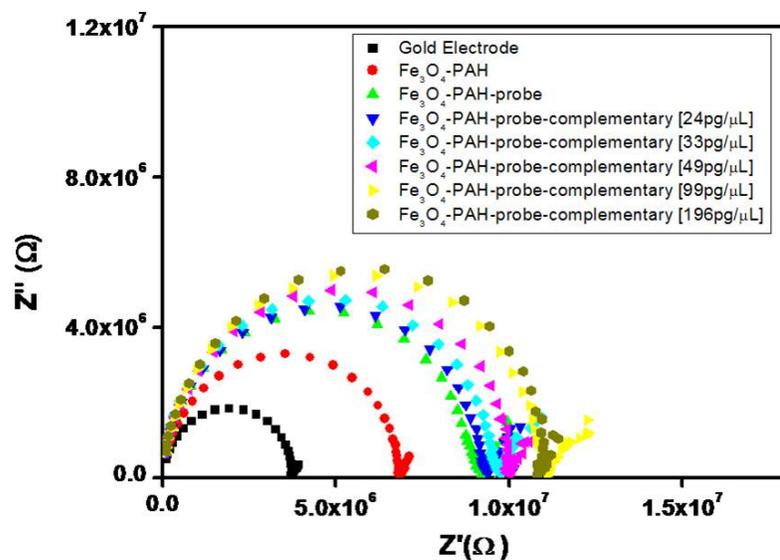
### Sensitivity measurements

The sensitivity of the sensor for *P. sclerotigenum* was also investigated by exposing the system to distinct concentrations of complementary DNA sequence (Fig. 5). The impedance spectra indicate that the increase in the  $R_e$  was directly proportional to the concentration of complementary sequence.

The performance of the modified gold electrode for detection of *P. sclerotigenum* genome was evaluated through the relative variation of this parameter ( $\Delta R_e$ ), according to

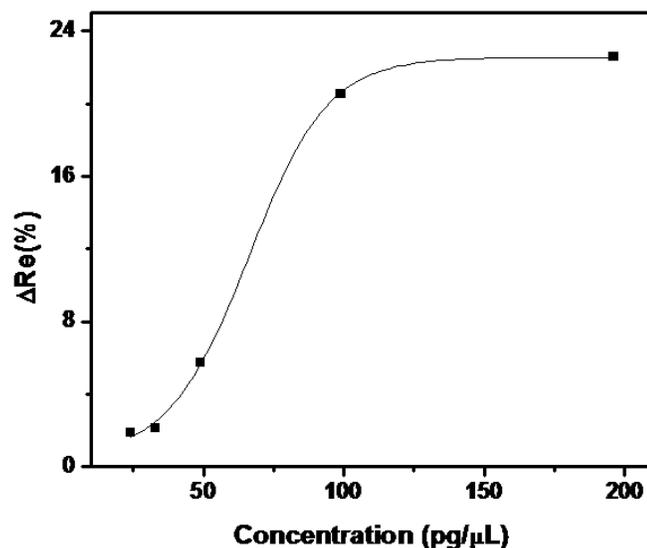
$$\Delta R_e(\%) = \left( \frac{R_e(H) - R_e(S)}{R_e(S)} \right) \times 100$$

Here,  $R_e(S)$  is the value of the resistance to the passage of the electric current of the system ( $Fe_3O_4$ -PAH-probe-modified gold electrode) and  $R_e(H)$  is the value of the resistance to passage of electric current in the hybridization process of the  $Fe_3O_4$ -HPA-probe system, after exposing the electrode to solutions containing complementary and non-complementary genomic sequences.



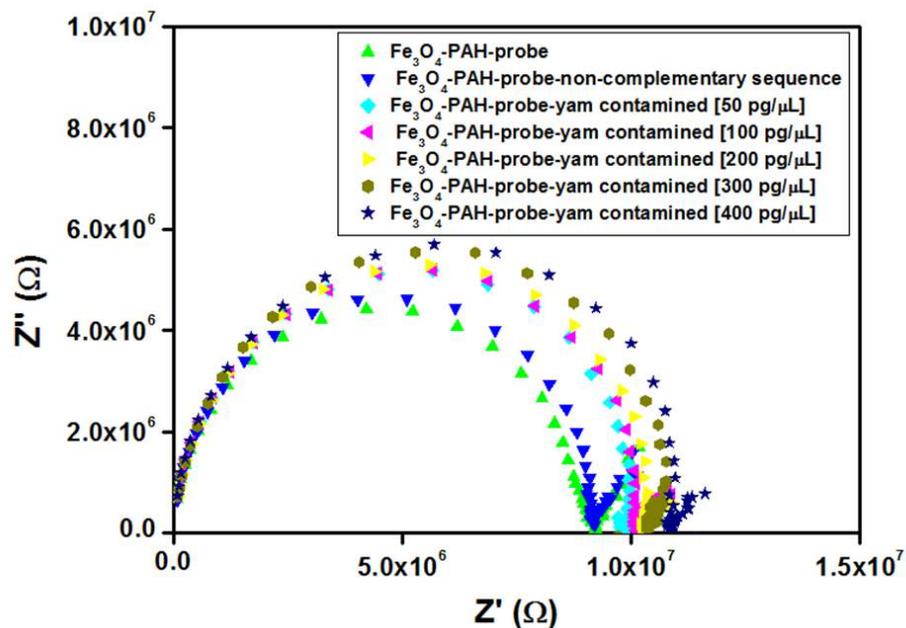
<< Fig. 5 >>

The results corresponding to the use of different concentrations on the  $\Delta R_e$  during the hybridization process between the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe system and complementary genome sequence are shown in Fig. 6. One can observe a systematic increase in the  $\Delta R_e$  values between 24  $\text{pg}/\mu\text{L}$  and 99  $\text{pg}/\mu\text{L}$  followed by a plateau, indicating a non-linear relationship between  $\Delta R_e$  and the DNA concentration. These results show that the hybridization can be assessed quantitatively using the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe biosystem. In addition, the high sensibility of the biosensor was demonstrated by using small volumes (2  $\mu\text{L}$ ) and low concentrations ( $\text{pg}/\mu\text{L}$ ) of the test samples.



<< Fig. 6 >>

Thereafter, we used real samples obtained from yam contaminated with *P. sclerotigenum*. From the data shown in Fig. 7, it can be observed an increase in  $R_e$  ( $10.40 \times 10^6 \Omega$ ) after interaction between the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe-modified gold electrode and the yam's genome contaminated. In Fig 8 we observed a gradual increase in the  $\Delta R_e$  values (ranging from 50 to 200  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ). Therefore, our data indicates that  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe system is capable of detect the presence of *P. sclerotigenum* in foods.



&lt;&lt; Fig. 7 &gt;&gt;

#### 4. Conclusions

In the present work we developed a biosensor for the detection of the genome of fungus *Penicillium sclerotigenum* based on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH-probe systems in yam. The  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PAH composite has a good biocompatibility, large surface-to-volume ratio and many binding sites for nucleotide immobilization, therefore confirming that it can be a good platform for the immobilization of biomolecules. This biosensor was capable to detect the fungus genome at low concentrations not only in a qualitative manner but also quantitatively, both in pure cultures of the fungus and in yam contaminated samples. This study is the first description of impedimetric sensor for detection of toxigenic strains of fungus in food contaminated with *Penicillium sclerotigenum*, as a model system. EIS was successfully applied for detection of DNA sequences of toxigenic fungi. The sensor showed good specificity and sensitivity, representing a promising tool for the development of improved quality control of foods.

### **Acknowledgements**

Da Silva would like to thank CAPES for a graduate scholarship.

**References**

- [1] M.N. Velasco-Garcia, T. Mottram, *Biosystems Eng.* 84 (2003) 1.
- [2] L.P. Lin, L.S. Huang, C.W. Lin, C.K. Lee, J.L. Chen, S.M. Hsu, S. Lin, *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 5 (2005) 61.
- [3] H.P.O. Nascimento, M.D.L. Oliveira, C.P. de Melo, G.J.L. Silva, M.T.S. Cordeiro, C.A.S. Andrade, *Coll. Surf. B-Biointerf.* 86 (2011) 414.
- [4] G. Bagni, D. Osella, E. Sturchio, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta* 573 (2006) 81.
- [5] J. Spadavecchia, M.G. Manera, F. Quaranta, P. Siciliano, R. Rella, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 894.
- [6] F. Zezza, M. Pascale, G. Mule, A. Visconti, *J. Microbiol. Methods* 66 (2006) 529.
- [7] P. Snevajsova, L. Tison, I. Brozkova, J. Vytrasova, R. Metelka, K. Vytras, *Electrochem. Commun.* 12 (2010) 106.
- [8] N.L. Wengenack, M. Binnicker, *Clin. Chest. Med.* 30 (2009) 391.
- [9] C.K.M. Tsui, J. Woodhall, W. Chen, C.A. Lévesque, A. Lau, C.D. Schoen, C. Baschien, M.J. Najafzadeh, G.S. Hoog, *IMA Fungus* 2 (2011) 177.
- [10] A.W. Peterson, R.J. Heaton, R. Georgiadis, *J. Amer. Chem. Soc.* 122 (2000) 7837.
- [11] S. Siddiquee, N.A. Yusof, A. Salleh, F. Abu Bakar, L.Y. Heng, *Bioelectrochem.* 79 (2010) 31.
- [12] E. Katz, L. Willner, *Eletoanal.* 15 (2003) 913.
- [13] J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*, Wiley, New York, 1987.
- [14] M. Sluyters-Rehbech, *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 1831.
- [15] J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and applications*, John Wiley: New York., 2001.
- [16] C.-Z. Li, Y. Liu, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.* 77 (2005) 478.

- [17] A. Li, F. Yang, Y. Ma, X. Yang, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1716.
- [18] I.S. Oliveira, E.D.M.N. Luz, R.M. Moura, L.C. Maia, *Fitopatol. Bras.* 32 (2007).
- [19] J.C. Frisvad, R.A. Samson, Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins, in: R.A. Samson, J.C. Frisvad (Eds.), *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and their extrolites. *Studies in Mycology* 2004.
- [20] O. Puel, I. Oswald, *Toxins* 2 (2010) 613.
- [21] R.R.M. Paterson, *Food Control.* 17 (2006) 741.
- [22] S.P. Gubin, Y.A. Koksharov, G.B. Khomutov, G.Y. Yurkov, *Russian Chem. Rev.* 74 (2005) 539.
- [23] P. Tartaj, M.P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzalez-Carreño, C.J. Serna, *J. Phys.D: Appl. Phys.* 36 (2003) R182.
- [24] M. Pita, J.M. Abad, C. Vaz-Dominguez, C. Briones, E. Mateo-Martí, J.A. Martín-Gago, M.P. Morales, V.M. Fernández, *J. Coll. Interf. Sci.* 321 (2008) 484.
- [25] H.D. Hill, R.A. Vega, C.A. Mirkin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 92183.
- [26] E.R. Sartori, H.H. Takeda, O. Fatibello-Filho, *Electroanal.* 23 (2011) 2526.
- [27] L. Yang, X. Ren, F. Tang, L. Zhang, *Biosens. Bioelectr.* 25 (2009) 889.
- [28] H.P. de Oliveira, C.A.S. Andrade, C.P. de Melo, *J. Coll. Interf. Sci.* 319 (2008) 441.
- [29] M.D.L. Oliveira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, F.B. Diniz, *Coll. Surf. B-Biointerf.* 66 (2008) 13.
- [30] M. Gheorghe, A. Guiseppi-Elie, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 95.

## Figure Captions

**Figure 1.** Schematic representation of the biosensor fabrication.

**Figure 2.** An AFM topographic image of the electrode surface modified with PAH (a), PAH-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (b) and PAH-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-probe-complementary (c). All scan areas were varied from 1.0µm × 1.0µm with a resolution of 512 × 512 pixels.

**Figure 3.** Nyquist (a) and Bode (b) plots of the stepwise modification process: (■) Gold electrode, (○) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH, (▲) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH-probe, (×) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH-probe-non-complementary, (◆) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PAH-probe-complementary sequence.

**Figure 4.** Equivalent circuit adopted to fit the impedance data, where R<sub>s</sub> is the ohmic resistance of the solution, C<sub>dl</sub> the capacitance double layer, W the Warburg impedance and R<sub>e</sub> the resistance to passage of electric current.

**Figure 5.** Nyquist plots of solutions of genome *P. sclerotigenum* at different concentrations.

**Figure 6.** ΔR<sub>e</sub>% of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-probe system after hybridization process with the *P. sclerotigenum* genome at different concentrations.

**Figure 7.** Nyquist plots of solutions obtained from yam contaminated with *P. sclerotigenum* at different concentrations.

**Figure 8.** ΔR<sub>e</sub>% of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-HPA-probe system after hybridization process with yam contaminated with *P. sclerotigenum* at different concentrations.