

Genossensores Eletroquímicos de Identificação de Espécies Vegetais: Foco no Castanheiro e Urze

Electrochemical Genosensors for Plant Species Identification: Focus on Chestnut and Heather

Stephanie Morais^{1,2}, Eduarda Pereira^{2,3}, Michelle Castanheira^{1,2}, Marlene Santos³,
Valentina F. Domingues¹, Cristina Delerue-Matos¹ e M. Fátima Barroso^{1,*}

¹REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4249-015 Porto, Portugal

²Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, s/n, 4169-007, Porto, Portugal

³REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 400, 4200-072, Porto, Portugal

(*e-mail: mfb@isep.ipp.pt)

<https://doi.org/10.19084/rca.39751>

Recebido/received: 2024.12.30

Aceite/accepted: 2025.03.04

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois genossensores eletroquímicos descartáveis para a identificação de plantas baseado na reação de hibridização entre duas cadeias de ADN complementares de duas espécies de plantas: *Erica arborea* (urze) e *Castanea sativa* (castanheiro). Analisando bases de dados públicas, foram selecionados dois pares de sequências especificamente cortadas e desenhadas para identificar o ADN da urze e do castanheiro. A construção do genossensor foi efetuada em três etapas: (i) Fase sensorial - criação de uma bicamada automontada constituída pelo ADN tiolado e o mercaptohexanol (MCH) na superfície do elétrodo descartável; (ii) Promoção da reação de hibridação do ADN em formato “sandwich” para aumentar a seletividade e; (iii) Detecção eletroquímica da reação de hibridação através da avaliação da reação de redução do substrato tetrametilbenzidina/peróxido (TMB/H₂O₂). Por cronopotenciometria obteve-se uma correlação linear entre a intensidade de corrente e a concentração de ADN alvo no intervalo de 0,03 a 2,00 nmol/L para *E. arborea* e 0,03 a 1,00 nmol/L para *C. sativa*. Os genossensores conseguiram detetar a reação de hibridização entre as cadeias de ADN sintéticas e ADN extraído das plantas. Assim, estes dispositivos são ferramentas simples e promissoras para detetar plantas e poderão ser usados na autenticação de produtos alimentares contendo urze e castanheiro.

Palavras-chave: *Castanea sativa*, *Erica arborea*, Genossensores eletroquímicos.

ABSTRACT

In this study, two disposable electrochemical genosensors based on the hybridization reaction between two complementary DNA probes were developed to determine the botanical origin of two plant species: *Erica arborea* (Heather) and *Castanea sativa* (Chestnut). Analyzing public databases, two sequences were specifically cut and designed to identify the heather e chestnut DNA in real samples. The genosensors' construction were carried out in three stages (i) Sensory phase: creation of a mixed self-assembled monolayer (SAM) consisting of the thiolated DNA and mercaptohexanol (MCH) on the surface of the disposable electrode; (ii) Promotion of the DNA hybridization reaction in a “sandwich” format to increase selectivity and; (iii) Electrochemical detection of the hybridization reaction through the evaluation of the reduction reaction of the tetramethylbenzidine/peroxide (TMB/H₂O₂) substrate. Using chronoamperometry, a linear correlation was obtained between the electrochemical current and the concentration of DNA-target probe in a 0.03 to 2.00 nmol/L range for *E. arborea* and 0.03 to 1.00 nmol/L for *C. sativa*. These genosensors detected the hybridization reaction between the synthetic and real DNA probes of both plants. Therefore, electrochemical genosensors emerge as a simple and promising analytical technique that can be used to authenticate food products that contain heather and chestnut DNA.

Keywords: *Castanea sativa*, *Erica arborea*, Electrochemical genosensor.

INTRODUÇÃO

A fraude alimentar como a contaminação e adulteração de alimentos e bebidas têm reforçado a importância de um rigoroso controlo da qualidade e segurança dos alimentos (Brooks *et al.*, 2021; FAO, 2021). Por isso, impulsionada pela intensa competição para produzir alimentos de alta qualidade e de valor acrescentado, bem como pela crescente preocupação com a origem e a segurança dos alimentos, a procura de métodos analíticos robustos, exatos, precisos e confiáveis para a autenticação e rastreabilidade de alimentos tem aumentado nas últimas décadas (Fanelli *et al.*, 2021; Lanubile *et al.*, 2024).

No setor agroalimentar, as fraudes alimentares mais denunciadas estão associadas à falsificação de especiarias, tal como o açafrão, e adulteração de azeite, óleo, vinho, cacau, mel e sumos de fruta (Manning & Soon, 2016). De acordo com a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) a adulteração de alimentos ocorre quando, por motivos económicos, um género alimentício é falsificado através da adição, subtração ou substituição, parcial ou total, de substâncias ou ingredientes. Convém realçar que a fraude alimentar afeta anualmente a indústria alimentar mundial em cerca de 30 mil milhões de euros (European Commission, 2018; FAO, 2021).

O foco deste trabalho são duas espécies vegetais comuns em Portugal, *Castanea sativa*, comumente designado de castanheiro, e *Erica arborea* conhecida por urze. O castanheiro, especialmente o seu fruto, é frequentemente utilizado em pratos mediterrâneos (e.g., castanha assada, puré de castanha, sopa de castanha) ou ainda processada para produzir farinha sem glúten, compota, licores, rebuçados e óleo de castanheiro (Santos *et al.*, 2022). Por outro lado, não existem vários pratos com urze. A urze é principalmente utilizada para fazer infusões devido ao seu efeito diurético e antissético, ou como adereço em confeitões (bolos e bolachas) e alguns pratos na região mediterrânica (Suna *et al.*, 2018). Ambas as espécies são reconhecidas como um ingrediente residual do mel, havendo uma grande diversidade de méis no mercado rotulados com o nome da espécie, sobretudo méis de urze.

Existem diferentes abordagens analíticas destinadas à verificação da autenticidade alimentar, nomeadamente a determinação da composição química e a identificação de metabolitos primários e secundários. Para isso podem-se utilizar diversas e diferentes técnicas analíticas como a análise da razão isotópica de carbono estável (Padovan *et al.*, 2003; Bontempo *et al.*, 2017), cromatografia gasosa (Ruiz-Matute *et al.*, 2007, 2010), cromatografia líquida (Cotte *et al.*, 2003; Amiry *et al.*, 2017), cromatografia de troca aniónica de alta eficiência (Morales *et al.*, 2008; Corradini *et al.*, 2012; Se *et al.*, 2018), cromatografia em camada fina (Puscas *et al.*, 2013), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Ribeiro *et al.*, 2014; Spiteri *et al.*, 2015), espectroscopia Raman (Yang & Ying, 2011) e espectroscopia de infravermelho (Anguebes *et al.*, 2016; Šugar & Bouř, 2016).

Quanto à autenticidade dos alimentos e à confirmação da origem certificada, especificamente para a atribuição do selo de qualidade Denominação de Origem Protegida (DOP), a análise de ADN é crucial, pois fornece dados valiosos sobre a caracterização genética, como a identificação de algumas espécies de plantas e assim como a identificação do cultivo de uma determinada variedade específica. Para muitas espécies vegetais e produtos de origem vegetal, a qualidade e o preço aplicado no mercado depende da variedade cultivada (Zambianchi *et al.*, 2021).

As metodologias analíticas mais usadas para identificar espécies e variedades de interesse comercial são baseadas em técnicas de biologia molecular, com a reação em cadeia da polimerase (PCR). A vantagem do uso da PCR está na possibilidade de identificar a amostra independentemente da idade, estado fisiológico, condição e tipo de tecido, e processamento da matriz inicial (Kang, 2019). Porém estas técnicas implicam o uso de equipamento muito dispendioso e de pessoal especializado.

Uma metodologia alternativa promissora e inovadora para a identificação e quantificação de ADN é a utilização de genossensores eletroquímicos (Masoomi *et al.*, 2024). Estes dispositivos analíticos são capazes de detetar a reação de hibridização entre

duas cadeias de ADN complementares imobilizadas num suporte físico, como, por exemplo, o ouro (Campuzano *et al.*, 2011). Estes dispositivos têm sido utilizados para diversos fins, uma vez que são portáteis, simples, fáceis de usar e económicos.

Neste trabalho foram construídos e otimizados genossensores eletroquímicos capazes de reconhecer o ADN de duas espécies vegetais, *C. sativa* (castanheiro), e *E. arborea* (urze), com elevada sensibilidade e seletividade. Esta ferramenta analítica tem como objetivo ser um auxílio valioso na avaliação da qualidade e na identificação da procedência botânica e geográfica, de produtos que contenham ADN de castanheiro e de urze. Após a otimização de todos os parâmetros analíticos, traçaram-se curvas de calibração a partir das quais foi possível validar e confirmar a presença de espécies como *E. arborea* e *C. sativa* nas respetivas amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e soluções

Os reagentes 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), 6-mercapto-1-hexanol (MCH), a solução tampão de sódio-fosfato de sódio-EDTA (SSPE 20×: fosfato de sódio 200 mmol/L, NaCl 3 mol/L, EDTA 20 mmol/L) a pH 7,4 foram comprados à empresa Sigma Aldrich. A solução tampão de fosfato (PBS) contendo caseína foi adquirida à Thermo Fisher, enquanto que o etanol absoluto e o fragmento do anticorpo antilfluoresceína-peroxidase (anti-FITC-POD) foram obtidos através da Carlo e Roche Diagnostics, respetivamente. Todos os reagentes utilizados neste ensaio foram de qualidade analítica, pelo que não foi necessária qualquer purificação.

Antes de ser utilizado, o tampão SSPE 20× foi diluído para uma concentração de SSPE 2× usando água ultrapura Milli-Q com condutividade igual a 0,054 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e resistividade de 18,200 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ obtida a partir de um sistema de purificação Millipore.

Aparelhos e eléctrodos

Os genossensores eletroquímicos foram construídos utilizando eléctrodos comerciais descartáveis serigrafados de ouro (SPGE) (C223BT, DropSens),

obtido a partir da empresa Ω Metrohm. Estes SPGE são constituídos por um eléctrodo de trabalho em ouro (\varnothing 1,6 mm), um eléctrodo de pseudoreferência de prata e um eléctrodo auxiliar de ouro, numa plataforma de cerâmica. O equipamento de medida consistiu num potenciostato/galvanostato eletroquímico Autolab (PGSTAT101, Ω Metrohm) equipado com o software NOVA 1.11.2, que foi utilizado para medir todos os sinais eletroquímicos.

Os cronoamperogramas foram registados a -0,1 V por 60 s. A intensidade de corrente utilizada para fins analíticos correspondeu à média das intensidades das correntes elétricas obtidas nos últimos 10 s da medição. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Oligonucleótidos

Para a construção do genossensor eletroquímico seletivo e específico para a urze e o castanheiro, foram desenhados dois conjuntos de sequências de ADN: uma sequência de ADN-alvo sintética de 98 pares de bases (pb) capaz de reconhecer a origem botânica da flor de urze e outra sonda de ADN-alvo com 103 pb para o castanheiro (Quadro 1). As suas sequências de ADN complementares foram clivadas em dois fragmentos de ADN menores, obtendo-se para a urze uma sonda de ADN de captura de 28 pb e uma sonda de ADN-sinalizadora de 70 pb e para o castanheiro uma sonda de ADN de captura e sonda de ADN sinalizadora com 22 pb e 81 pb, respetivamente.

As sondas de ADN de captura e de sinalização também foram projetadas para minimizar a formação de estruturas secundárias, uma vez que numa superfície plana (como o eléctrodo de ouro) estruturas secundárias fortes podem dificultar o processo de hibridização (Campuzano *et al.*, 2011).

As sequências de oligonucleótidos (Quadro 1) utilizadas neste estudo foram adquiridas, na forma de sal liofilizado, à empresa Eurogentec. Cada solução-mãe de oligonucleótidos foi ressuspensa a uma concentração de 100 nmol/L com água ultrapura Milli-Q e armazenada a -20°C . Os oligonucleótidos de trabalho foram preparados diariamente diluindo-se, até à concentração necessária, com o tampão SSPE 2×.

Quadro 1 - Sequências de oligonucleótidos

Oligonucleótidos	Sequência 5' → 3'	Número de bases
Erica-ADN-captura	GAC CTT CTT TTT AGG CCA ACC GAG CAC A-SH	28
Erica-ADN-sinalizadora	FAM-GAC TGC GTA GCA TGC ACA ACG TGT CGC AGT TTG GCA ACC ACC ACT TGT TGT GAT GTC CGT CAT CAG G	70
Erica-ADN-alvo	TGT GCT CGG TTG GCC TAA AAA GAA GGT CCC TGA TGA CGG ACA TCA CAA CAA GTG GTG GTT GCC AAA CTG TCG CGA CAC GTT GTG CAT GCT ACG CAG TC	98
Castanea-ADN-captura	SH-ATC AGA GGA TGA GTG GGA CCA C	22
Castanea-ADN-sinalizadora	CTA TAA AAT TTC ATG ACT CTA TGA ATT GTG TGT GTG TGT GTG GGG AGA TTT CCA TTG ATA TGG CGG GCT GTC TTC-FAM	81
Castanea-ADN-alvo	GAA GAC AGC CCG CCA TAT CAA TGG AAA TCT CCC CAC ACA CAC ACA CAC AAT TCA TAG AGT CAT GAA ATT TTA TAG GTG GTC CCA CTC ATC CTC TGA	103
Urze - Forward Primer	TGT GCT CGG TTG GCC TAA AA	20
Urze - Reverse Primer	GAC TGC GTA GCA TGC ACA AC	20
Castanha - Forward Primer	GAA GAC AGC CCG CCA TAT CA	20
Castanha - Reverse Primer	ATC AGA TGA GTG GGA CC	18

Extração e amplificação de ADN de folhas de castanheiro e de urze

As folhas de *E. arborea* e *C. sativa* foram obtidas de plantas identificadas no Jardim Botânico do Porto (Portugal). Ambas as plantas foram secas com azoto líquido e o seu ADN genómico extraído por trituração mecânica com recurso a um almofariz e pilão de ferro.

A amplificação do ADN das sequências alvo foi realizada usando-se a técnica convencional de PCR. O desenho dos primers – sequências específicas de nucleótidos que permitem a amplificação da região de interesse – foi realizado utilizando Primer-Blast (NCBI) (Ye *et al.*, 2012) adquirido à empresa Eurogentec. O protocolo estabelecido pela Bioron foi usado na preparação das misturas de soluções utilizadas na técnica de PCR, e o termociclador MyCycler™ dos Laboratórios BioRad foi utilizado para a amplificação das amostras.

Genossensor eletroquímico

Quatro etapas foram aplicadas para a construção dos genossensores eletroquímicos: i) Pré-tratamento; ii) Fase sensorial: criação de uma bicamada automontada (SAM) mista constituída pelo ADN tiolado e o mercapto-hexanol (MCH) na superfície do eléctrodo serigrafado de ouro (SPGE); iii) Promoção da reação de hibridação do ADN em formato “sandwich” para aumentar a seletividade

e; iv) Detecção eletroquímica da reação de hibridação através da avaliação da reação de redução do substrato comercial tetrametilbenzidina/peróxido (TMB/H₂O₂). A Figura 1 ilustra as principais etapas envolvidas na construção destes genossensores eletroquímicos.

O pré-tratamento consistiu na limpeza da superfície do eléctrodo com etanol, água extra pura e secagem com nitrogénio gasoso. Para garantir a imobilização orientada das sondas de ADN de captura, foi criada uma interface automontada composta pela sonda de ADN de captura e o espaçador MCH. Para isso, 3 µL da sonda de ADN de captura de cada espécie (com uma concentração inicial de 1 nmol/L) foi imobilizada na superfície dos eléctrodos de trabalho dos SPGE e armazenados numa placa de Petri humidificada, durante a noite. No dia seguinte, os eléctrodos modificados, com o ADN de captura, foram lavados com o tampão SSPE 2x (400 µL), a fim de remover as sondas fracamente ligadas à superfície do eléctrodo. Posteriormente, foram adicionados 3 µL de MCH.

O ensaio de hibridização em formato sanduíche foi efetuado em duas etapas. Primeiro, a hibridização homogénea ocorreu quando a sonda de ADN de sinalização ligou-se ao ADN alvo durante 30 min. Em seguida, a solução resultante da hibridização foi adicionada ao SPGE modificado, permitindo a formação de ADN duplex com a sonda de ADN de captura imobilizada no SPGE. Após 60 min, os SPGE foram lavados com SSPE 2x de modo a remover as

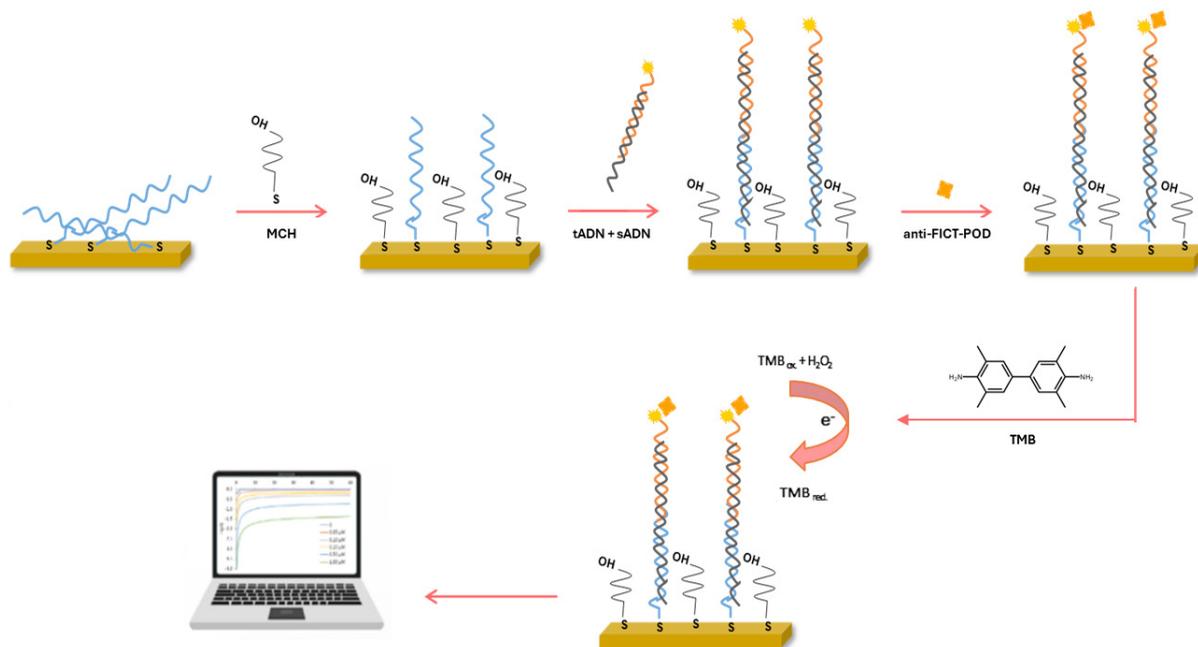


Figura 1 - anti-FITC-POD - anticorpo anti-fluoresceína-peroxidase; MCH - Mercaptohexanol; tADN - ADN alvo; sADN - ADN marcado com fluoresceína; TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina.

sequências inespecíficas e livres que se encontram à superfície do eletrodo.

De forma a detetar o sinal eletroquímico, 1,50 U/mL do fragmento de anticorpo ligado à enzima peroxidase (POD) foram adicionados à superfície do eletrodo de trabalho. O eletrodo foi lavado novamente com SSPE 2x 30 minutos depois.

Finalmente, o genossensor eletroquímico foi conectado ao potenciostato e foram adicionados 40 μ L do substrato TMB/ H_2O_2 para cobrir totalmente o eletrodo durante 1 min. A deteção do produto oxidado enzimaticamente foi realizada por cronoamperometria a 0,10 V, durante 60 s. Foram realizadas três repetições para todas as medições.

O desempenho do genossensor foi avaliado através da análise da razão entre a intensidade de corrente eletroquímica obtida nos ensaios quando se usou uma determinada concentração de ADN-alvo (S) e a intensidade de corrente nos ensaios desprovidos de ADN-alvo (B), designado de ensaio em branco, ou seja, pelo ensaio com a melhor razão S/B.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No mercado existem produtos alimentares como, por exemplo, o mel, licores, bebidas vegetais e refeições pré-preparadas que indicam na sua composição (rótulo) a presença de castanha e/ou urze. Porém, na maioria das vezes, esta indicação é fraudulenta, i.e., esses produtos alimentares não contêm na realidade estas plantas na sua composição. Por isso, a construção de sensores baseados na deteção de ADN de *C. sativa* e de *E. arborea* poderão ser utilizados para verificar a autenticidade dos produtos alimentares.

Otimização dos parâmetros experimentais

Visto que a utilização de um formato de reação de hibridização em sanduíche aumenta a seletividade do sensor, uma vez que ocorrem dois eventos de reação de hibridização independentes, este trabalho experimental seguiu essa estratégia, sendo que primeiramente se efetuou a hibridização parcial em fase homogénea entre a sonda de ADN alvo e a

sonda de ADN sinalizadora, e posteriormente a hibridização total entre a sonda de ADN de captura imobilizada no eletrodo e o resultado da hibridização homogênea.

Para maximizar a reação de hibridização do ADN, uma camada binária automontada constituída pela sonda de ADN de captura específica da urze e/ou castanheiro e o MCH foi efetuada à superfície do SGPE. Similarmente e de forma a aumentar a eficiência do genossensor foram otimizados os seguintes parâmetros analíticos durante a construção e desenvolvimento do genossensor: concentração das sondas de ADN de captura, ADN alvo e ADN de sinalização, tempo de incubação da reação de hibridização homogênea e heterogênea, concentração e tempo de incubação do anticorpo e do espaçador MCH.

Para iniciar o processo de otimização dos genossensores, a influência da concentração da sonda de ADN de captura imobilizada no SPGE na intensidade de corrente foi determinada. Para tal, seis concentrações de ADN de captura diferentes e que variaram entre 0,25 e 10,00 $\mu\text{mol/L}$ foram testadas (Figura 2).

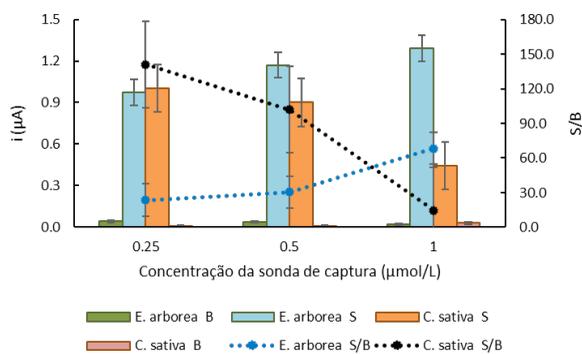


Figura 2 - Efeito da concentração da sonda de ADN de captura na resposta cronoamperométrica. Os valores do branco (B) de *Erica arborea* e *Castanea sativa* estão representados, respetivamente, em verde e rosa, a azul-claro e laranja para o sinal (S) e azul-escuro e preto para a relação S/B. Barras representam o erro padrão derivado das três réplicas. Concentração de ADN alvo = 1,0 nmol/L, concentração de MCH = 1,0 mmol/L, tempo de incubação de MCH = 30 min, tempo de incubação da hibridização homogênea e heterogênea = 30 min e 60 min, respetivamente, concentração e tempo de incubação da sonda de sinalização = 0,25 $\mu\text{mol/L}$, durante 30 min, a concentração e tempo de incubação do anticorpo (anti-FITC-POD) = 1,0 U/mL, por 30 min.

Conforme se observa na Figura 2, há uma clara diferença nas intensidades de corrente e na relação S/B entre todas as concentrações de ADN de captura testadas e entre as duas espécies. Para *E. arborea* quanto maior a concentração da sonda de ADN captura maior a intensidade de corrente eletroquímica registada. Os eletrodos imobilizados com concentração de 1,00 $\mu\text{mol/L}$ apresentaram a maior relação S/B (68,40), assim como a melhor intensidade de corrente (1,29 μA). Por outro lado, quanto maior a concentração de ADN-captura de *C. sativa* menor a resposta eletroquímica; a melhor razão S/B (141,00) e a maior intensidade de corrente (1,00 μA) foram obtidos com a concentração de 0,25 $\mu\text{mol/L}$. Portanto, todas as futuras otimizações prosseguirão utilizando a concentração de 0,25 $\mu\text{mol/L}$ e 1,00 $\mu\text{mol/L}$ para *C. sativa* e *E. arborea*, respetivamente.

De acordo com estudos anteriores (Campuzano *et al.*, 2011), é possível obter mais eficiência na resposta eletroquímica se os oligonucleótidos, modificados com um grupo tiol numa das extremidades (Quadro 1) forem orientados verticalmente na forma de monocamadas automontadas (SAMs). Acresce que grupos tiolados funcionalizados em substratos de ouro são frequentemente usados em estudos bioquímicos devido à sua capacidade de incorporar outros grupos funcionais e fornecer alta estabilidade e reprodutibilidade graças à sua forte ligação covalente com o ouro (Campuzano *et al.*, 2011). Assim e tirando proveito destas propriedades, imobilizou-se em simultâneo com a sequência de ADN, o MCH de modo a garantir a orientação do ADN, e reduzir a adsorção inespecífica de biomoléculas e aumentar a permeabilidade de moléculas pequenas tais como o substrato TMB (Campuzano *et al.*, 2011; Barroso *et al.*, 2015). Assim, a influência da concentração e tempo de incubação do MCH nos sinais de corrente eletroquímica estão representados na Figura 3A e na Figura 3B, respetivamente.

A concentração do MCH no SPGE foi estudada numa gama de concentrações entre 0,00 e 1,00 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 3A) e o seu tempo de incubação entre os 15 min e 30 min (Figura 3B).

Para ambas as espécies, a menor relação S/B (39,22 e 128,52 para a urze e o castanheiro, respetivamente) foi obtida na ausência do espaçador, i.e.,

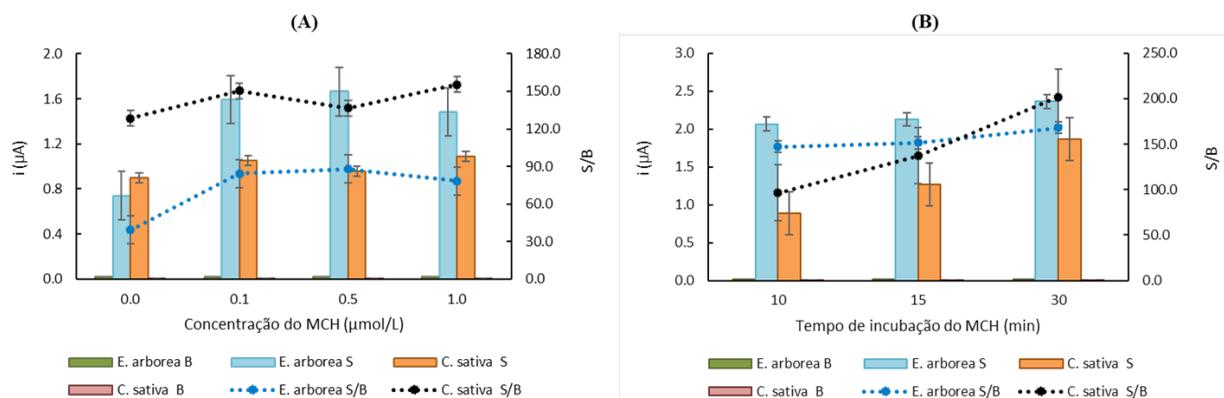


Figura 3 - Resposta cronoamperométrica obtida sobre a influência da (A) concentração do espaçador MCH e (B) do seu tempo de incubação. Os valores do branco (B) de *Erica arborea* e *Castanea sativa* estão representados, respetivamente, em verde e rosa, a azul-claro e laranja para o sinal (S) e azul-escuro e preto para a relação S/B. Barras representam o erro padrão derivado das três réplicas.

nos elétrodos sem o MCH. Este resultado está de acordo com o que se encontra descrito na literatura (Campuzano *et al.*, 2011). Por outro lado, os melhores resultados analíticos foram obtidos, para a urze e castanheiro, nos elétrodos imobilizados com MCH de concentração 0,50 μmol/L e 1,00 μmol/L, apresentando uma relação S/B de 88,13 e 155,35, respetivamente. Estas concentrações de MCH também foram as que apresentaram a maior intensidade de corrente (1,66 μA para *E. arborea* e 1,09 μA para *C. sativa*). Portanto, todas as otimizações seguintes foram realizadas usando uma concentração de 0,50 μmol/L do espaçador MCH para a urze e 1,00 μM para o castanheiro.

Relativamente à influência do tempo de incubação do MCH (Figura 3B) no SPGE, verifica-se que o aumento do tempo de incubação intensifica a intensidade de corrente. As maiores intensidades de corrente (2,36 μA para a urze e 1,87 μA para o castanheiro), assim como a melhor relação S/B (S/B = 168,09 para *E. arborea* e S/B = 201,91 para *C. sativa*) foram registadas após 30 min de incubação. Todavia, os tempos de incubação testados para *E. arborea* apresentaram relações S/B próximas entre si (147,07; 151,47; 168,09 para 10, 15 e 30 minutos de incubação, respetivamente).

Como foi referido, um formato de reação de hibridização em sanduíche foi adotado para a construção do genossensor eletroquímico. Esta estratégia foi elaborada em dois passos: a hibridização homogénea e heterogénea (Barroso *et al.*, 2015).

A hibridização homogénea resultou da hibridização parcial entre as sondas de ADN alvo e de ADN -sinalizadora, realizada num microtubo de 1,50 mL. Para que esta reação ocorra, tanto as sondas de ADN-alvo como as sondas de sinalização de ADN têm de quebrar as suas estruturas secundárias e alinhar-se espontaneamente. Em alguns casos, este alinhamento pode ser acelerado utilizando-se temperaturas mais elevadas (Orozco & Medlin, 2011; Morais *et al.*, 2021). Por outro lado, a hibridização heterogénea ocorre quando na superfície do eletrodo modificado com MCH e ADN de captura é adicionado o complexo híbrido ADN-alvo-sinalizador preparado na hibridização homogénea, ocorrendo assim a hibridização completa do material sintético (Campuzano *et al.*, 2011).

A influência do tempo de incubação da hibridização homogénea (Figura 4A) e heterogénea (Figura 4B) na intensidade de corrente é outro passo essencial para a otimização do genossensor eletroquímico. Assim, avaliou-se o efeito do aumento do tempo de reação da hibridização homogénea (de 15 a 60 min) e da hibridização heterogénea (de 30 a 90 min) na intensidade de corrente.

Para a hibridização homogénea, obteve-se a maior intensidade de corrente para a urze (4,48 μA) e castanheiro (2,51 μA), bem como a melhor relação S/B (S/B = 179,08 para a urze e 185,61 para o castanheiro), após um período de incubação de 30 min (Figura 4A). Por outro lado, a reação de hibridização heterogénea apresentou a melhor relação

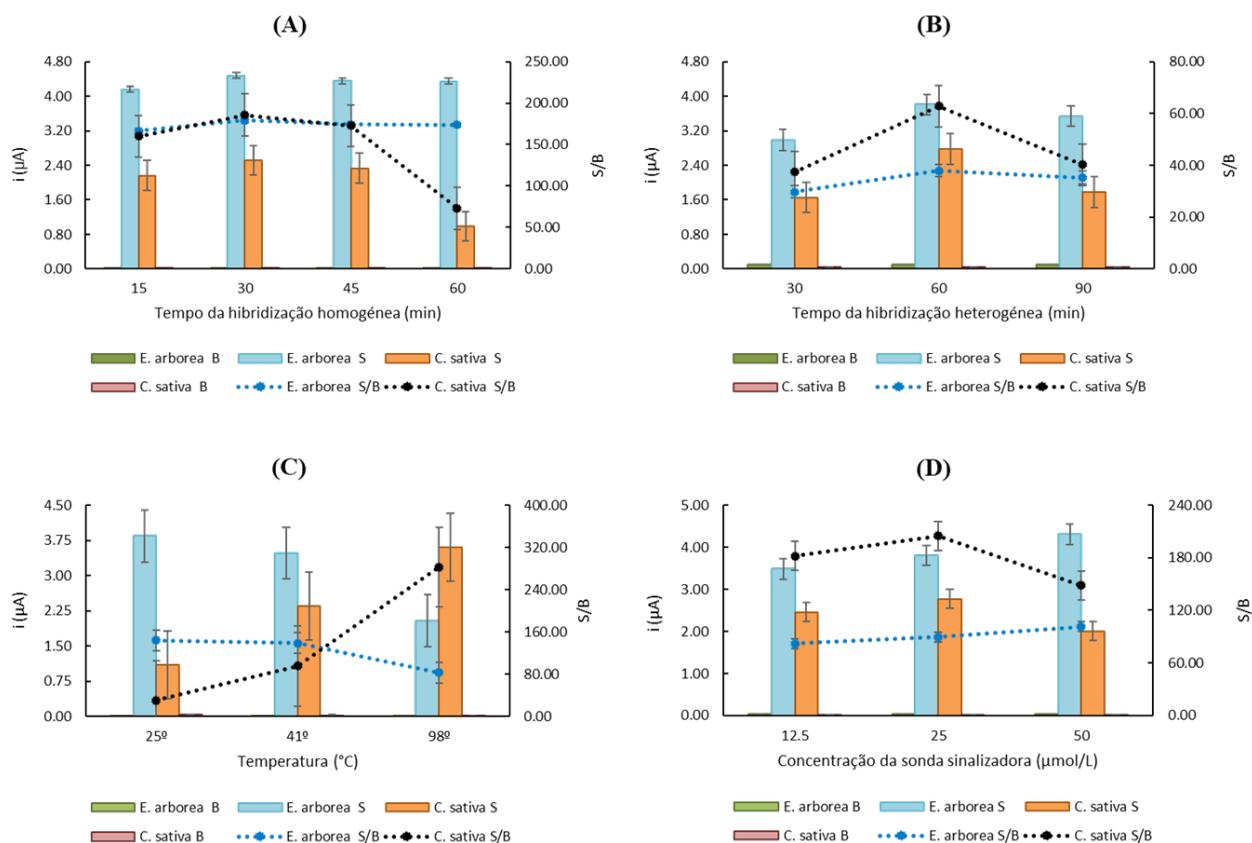


Figure 4 - Respostas cronoamperométricas obtidas sobre o efeito do tempo de incubação de hibridização (A) homogênea; (B) tempo de incubação heterogênea; (C) temperatura de hibridização homogênea e (D) concentração da sonda de sinalização de ADN. Os valores do branco (B) de *Erica arborea* e *Castanea sativa* estão representados, respetivamente, em verde e vermelho, a azul-claro e laranja para o sinal (S) e azul-escuro e preto para a relação S/B. Barras representam o erro padrão derivado das três réplicas.

S/B e a maior intensidade de corrente após 60 min de incubação para ambas as espécies (Figura 4B). Registou-se uma intensidade de corrente de $3,80 \mu\text{A}$, com um razão de S/B de 37,90 com *E. arborea* e uma intensidade de $2,78 \mu\text{A}$ e razão S/B igual a 62,77 com *C. sativa*.

Para testar a influência da temperatura durante a reação da hibridização homogênea, foram avaliadas três temperaturas entre os 25°C a 98°C (Figura 4C). Utilizando-se os parâmetros ótimos determinados previamente, especificamente o tempo de incubação da hibridização homogênea (30 min), a melhor relação S/B para *E. arborea* (S/B = 144,07) foi obtida à temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 1,00^\circ\text{C}$), com uma intensidade de corrente de $3,85 \mu\text{A}$. Porém, com *C. sativa* registou-se a melhor razão S/B (S/B =

283,92), bem como a maior intensidade de corrente ($3,61 \mu\text{A}$), após uma incubação a 98°C .

Visto que o sinal eletroquímico obtido é proporcional à concentração ADN alvo presente na superfície do elétrodo, o passo seguinte a otimizar foi a concentração do ADN sinalizador (Figura 4D). A influência da concentração da sonda de ADN sinalizadora na eficiência da hibridização homogênea foi avaliada entre 12,50 e $50,00 \mu\text{mol/L}$. Para *E. arborea*, quanto maior a concentração da sonda de ADN sinalizadora maior a intensidade de corrente registada. A urze obteve a maior razão S/B (S/B = 101,54) e a maior intensidade de corrente ($i = 4,41 \mu\text{A}$) com $50,00 \mu\text{mol/L}$. No entanto, com o castanheiro observou-se a maior intensidade de corrente ($i = 2,77 \mu\text{A}$) e razão S/B (S/B = 205,07) com a

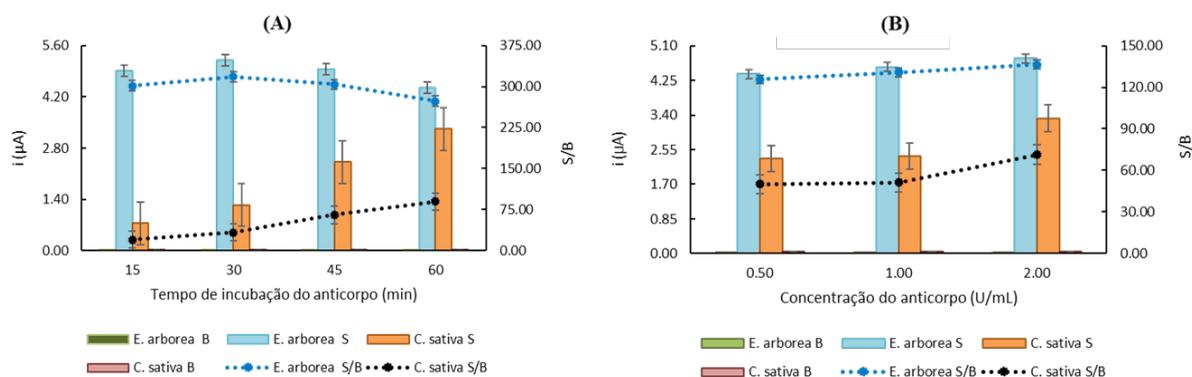


Figura 5 - Respostas cronoamperométricas adquiridas ao otimizar a concentração (A) e o tempo de incubação (B) do anticorpo anti- FITC-POD. Os valores do branco (B) de *Erica arborea* e *Castanea sativa* estão representados, respetivamente, a verde e vermelho, a azul-claro e laranja para o sinal (S) e azul-escuro e preto para a relação S/B. Barras representam o erro padrão derivado das três réplicas.

concentração de 25,00 $\mu\text{mol/L}$ de ADN-sinalizador (Figura 4D).

O fragmento do anticorpo encontra-se ligado a uma enzima (POD-Peroxidase) que por sua vez se liga à fluoresceína incorporada na sonda de ADN-sinalizador. O estudo da influência da concentração (de 0,50 a 2,00 U/mL) e do tempo de incubação (de 15 a 60 min) do anticorpo no sinal eletroquímico (Figura 5 A e 5B, respetivamente) foi avaliado.

Para ambas as espécies, quanto maior a concentração do anticorpo, maior a resposta eletroquímica (Figura 5A). As sondas para *E. arborea* apresentaram uma relação S/B de 136,44 e uma intensidade de corrente média de 4,78 μA , enquanto para *C. sativa* registou-se uma razão S/B de 71,38 com uma

intensidade de corrente de 3,32 μA para uma concentração de 2,00 U/mL de anticorpo.

Por outro lado, na análise da influência do tempo de incubação do anticorpo na intensidade de corrente verifica-se que, para o castanheiro, quanto maior o período de incubação, maior a relação S/B e maior a intensidade de corrente obtida nas medições eletroquímicas. Assim, a melhor razão S/B (S/B = 89,68) e a maior intensidade de corrente ($i = 3,32$) foram obtidos após 60 min de incubação. Já a urze registou a melhor relação S/B (S/B = 318,17) e intensidade de corrente (5,19 μA) com apenas 30 min de incubação.

O Quadro 2 resume os resultados de todos parâmetros analíticos avaliados neste estudo.

Quadro 2 - Valores selecionados para as variáveis analíticas utilizadas na construção do genossensor eletroquímico

Variáveis	<i>Erica arborea</i>		<i>Castanea sativa</i>	
	Valores testados	Valores selecionados	Valores testados	Valores selecionados
Concentração da sonda de captura (μM)	0,25–1,00	1,00	0,25–1,00	0,25
Concentração do MCH (μM)	0,00–1,00	0,10	0,00–1,00	1,00
Tempo de incubação do MCH (min)	15–30	30	15–30	30
Tempo da hibridização homogénea (min)	15–60	30	15–60	30
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25–98	25	25–98	98
Tempo da hibridização heterogénea (min)	30–90	60	30–90	30
Concentração da sonda sinalizadora (μM)	12,50–50,00	50,00	12,50–50,00	25,00
Concentração do anticorpo (U/mL)	0,50–2,00	2,00	0,50–2,00	2,00
Tempo de incubação do anticorpo (min)	15–60	30	15–60	60

Características analíticas

Utilizando-se as condições analíticas otimizadas (Quadro 2), estudou-se o desempenho do genossensor eletroquímico por cronoamperometria utilizando concentrações crescentes de ADN alvo (0,03 a 5,00 nmol/L) da urze e do castanheiro (Figura 6).

Uma relação linear com coeficiente de correlação (R^2) de 0,9944 entre a intensidade de corrente e a concentração do ADN alvo sintético foi obtida para *E. arborea* na gama de 0,03–2,00 nmol/L, com declive e ordenada na origem de $3,3161 \pm 0,0028$ ($\mu\text{A}/\text{nmol}/\text{L}$) e $0,0054 \pm 0,0010$ (μA), respetivamente. Por outro lado, *C. sativa* apresentou uma relação de linear ($R^2 = 0,9917$) no intervalo de 0,03 a 1,00 nmol/L, com o valor de declive e ordenada na origem de $1,0266 \pm 0,0348$ ($\mu\text{A}/\text{nmol}/\text{L}$) + $0,0202 \pm 0,0002$ (μA).

Os limites de deteção e quantificação (LOD e LOQ) calculados como três vezes e dez vezes o desvio-padrão estimado dos ensaios em branco (medidas cronoamperométricas registadas na ausência de ADN alvo) dividido pelo valor pelo declive da reta de calibração linear foram, respetivamente, $2,51 \times 10^{-3}$ nmol/L e $3,11 \times 10^{-3}$ nmol/L para o ADN da urze e $1,02 \times 10^{-2}$ nmol/L e $1,00 \times 10^{-2}$ nmol/L para o castanheiro.

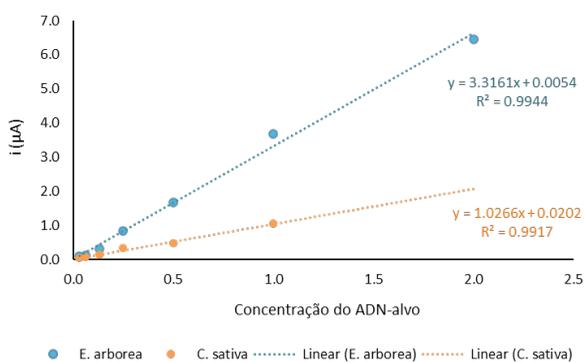


Figura 6 - Curvas de calibração para *Erica arborea* (a azul) e *Castanea sativa* (a laranja).

Aplicação do genossensor eletroquímico na deteção das espécies em folhas de plantas

Para demonstrar a sensibilidade e viabilidade do genossensor eletroquímico construído, este foi testado com ADN genómico extraído, de folhas de urze e castanheiro, por PCR convencional. A Figura 7 mostra as intensidades de corrente cronoamperométricas obtidas na ausência ou presença de 1 nmol/L do ADN alvo sintético de ambas as espécies (Sp), 1 nmol/L do ADN amplificado de folhas de *E. arborea* e *C. sativa* (Rs) e com uma amostra de ADN não complementar (Nc) a cada espécie. Para além disso, e de modo a determinar a influência dos primers no genossensor eletroquímico, também foi testada uma amostra em branco com os produtos de PCR (Bp). Todos os resultados foram determinados com os parâmetros ótimos avaliados anteriormente.

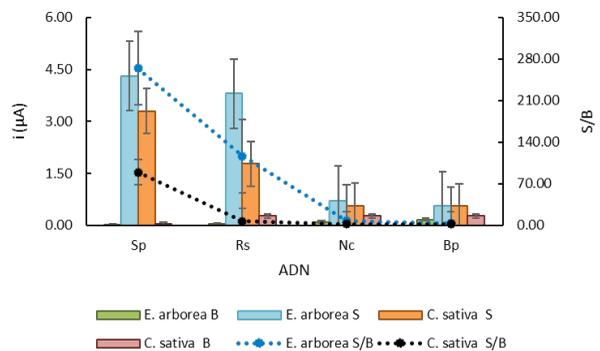


Figura 7 - Comparação entre as respostas cronoamperométricas do ADN sintético com o ADN das espécies vegetais amplificado. Os valores do branco (B) de *Erica arborea* e *Castanea sativa* estão representados, respetivamente, a verde e rosa, a azul-claro e laranja para o sinal (S) e azul-escuro e preto para a relação S/B. Barras representam o erro padrão derivado das três réplicas. Bp – Branco obtido no produto de PCR; Nc - Sequências de oligonucleótidos não complementares; Rs – ADN extraído das plantas; Sp – Sequência de oligonucleótido sintético.

A seletividade e especificidade do genossensor foi confirmado através da utilização de sondas de ADN não complementares à espécie *E. arborea* e *C. sativa*. Conforme se pode visualizar na Figura 7, o genossensor detetou e identificou seletivamente com sucesso o ADN extraído das folhas de *E. arborea* e *C. sativa*. Comparando as intensidades de corrente obtidas quando se usou ADN extraído das

plantas com o ADN sintético, verifica-se que existe uma diferença de 14,99 % entre o ADN extraído da folha da urze e o seu respetivo ADN sintético. Para *C. sativa* os sinais apresentam uma diferença de intensidade de 24,74% com o correspondente ADN sintético.

Assim, e avaliando os resultados apresentados na Figura 7, verifica-se que nos ensaios em que foi utilizado ADN não complementar, a reação de hibridização não ocorreu e, por isso, a intensidade de corrente foi muito baixa ($i = 0,71$ A para a urze e $i = 0,57$ A para o castanheiro) e semelhante ao ensaio em branco, confirmando-se que este design de sensor é uma opção viável para identificar ADN de *E. arborea* e *C. sativa* a partir de folhas de plantas.

CONCLUSÕES

Um genossensor eletroquímico foi desenhado e montado num elétrodo de ouro serigrafado tendo-se obtido um sensor com uma elevada sensibilidade e seletividade capaz de detetar o ADN genómico extraído de duas espécies de plantas, *E. arborea* e *C. sativa*.

O genossensor apresenta um bom desempenho apresentando valores de LOD e LOQ na gama dos 30 e 100 pM para *E. arborea* e *C. sativa*, respetivamente. A utilização de ADN, extraído e amplificado por PCR, proveniente de castanheiros e urzes existentes no Jardim Botânico do Porto, Portugal permitiu validar e realçar a seletividade e sensibilidade do genossensor. O genossensor desenvolvido mostrou-se ser altamente seletivo, pois permitiu detetar ADN proveniente das folhas de ambas as espécies (ADN complementar aos oligonucleótidos

utilizados na construção do sensor) enquanto para as amostras de ADN não complementares (proveniente de outras amostras de plantas) apresentaram um sinal eletroquímico semelhante à solução desprovida de ADN, ou seja, intensidades semelhantes aos brancos.

Estes dispositivos inovadores e fáceis de usar poderão ser usados para detetar as plantas urze e castanheiro em produtos alimentares, tais como mel, e licores.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio financeiro de fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia e Ministério para a Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (FCT/MECI) através do projeto MTS/SAS/0077/2020—"Honey+ – Novas estratégias para valorizar o mel do Parque Natural de Montesinho: Um bioindicador da qualidade ambiental e o seu potencial terapêutico", também teve apoio no âmbito do projeto UID/50006 – Laboratório Associado para a Química Verde – Tecnologias e Processos Limpos, e também teve apoio do projeto ALGAESAFE: EFSA European Food Risk Assessment Fellowship (EU-FORA) Programme.

Fátima Barroso agradece à FCT o contrato de investigador auxiliar (2020.03107.CEECIND. Stephanie Morais (2023.028929.BD), Michelle Castanheira (2023.05159.BDANA) e Eduarda Pereira (2024.01697.BDANA) agradecem à FCT e à União Europeia (EU) pelas bolsas financiadas pelo POPH-QREN-Tipologia 4.1-Formação Avançada, suportada pelo Social Europeu (FSE) and Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amiry, S.; Esmaili, M. & Alizadeh, M. (2017) - Classification of adulterated honeys by multivariate analysis. *Food Chemistry*, vol. 224, p. 390-397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.025>
- Anguebes, F.; Pat, L.; Ali, B.; Guerrero, A.; Córdova, A.V.; Abatal, M. & Garduza, J.P. (2016) - Application of multivariable analysis and FTIR-ATR spectroscopy to the prediction of properties in campeche honey. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2016, art. 5427526. <https://doi.org/10.1155/2016/5427526>
- Barroso, M.F.; Freitas, M.; Oliveira, M.B.P.P.; de-los-Santos-Alvaréz, N.; LoboCastañón, M.J. & Delerue-Matos, C. (2015) - 3D-nanostructured Au electrodes for the event-specific detection of Mon810 transgenic maize. *Talanta*, vol. 134, p. 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.10.017>
- Bontempo, L.; Camin, F.; Ziller, L.; Perini, M.; Nicolini, G. & Larcher, R. (2017) - Isotopic and elemental composition of selected types of Italian honey. *Measurement*, vol. 98, p. 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2015.11.022>
- Brooks, C.; Parr, L.; Smith, J.M.; Buchanan, D.; Snoich, D & Hebishy, E. (2021) - A review of food fraud and food authenticity across the food supply chain, with an examination of the impact of the COVID-19 pandemic and Brexit on food industry. *Food Control*, vol. 130, art. 108171. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108171>
- Campuzano, S.; Kuralay, F.; Lobo-Castañón, M.J.; Bartosík, M.; Vyavahare, K.; Palecek, E.; Haake, D.A. & Wang F. (2011) - Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and sensitive electrochemical detection in untreated clinical samples. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, n. 8, p. 3577-3583. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.02.004>
- Corradini, C.; Cavazza, A. & Bignardi, C. (2012) - High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, vol. 2012, art. 487564. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/487564>
- Cotte, J.-F.; Casabianca, H.; Chardon, S.; Lheritier, J. & Grenier-Loustalot, M.-F. (2003) - Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity. *Journal of Chromatography A*, vol. 1021, n. 1-2, p. 145-155. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.005>
- European Commission (2018) - *The EU Food Fraud Network and the System for Administrative Assistance - Food Fraud. Annual report* [online].
- Fanelli, V.; Mascio, I.; Miazzi, M.M.; Savoia, M.A.; De Giovanni, C. & Montemurro, C. (2021) - Molecular approaches to agri-food traceability and authentication: An updated review. *Foods*, vol. 10, n. 7, art. 1644. <https://doi.org/10.3390/foods10071644>
- FAO (2021) - *Food safety technical toolkit for Asia and the Pacific. Food fraud - Intention, detection and management*. Bangkok.
- Kang, T.S. (2019) - Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 91, p. 574-585. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.037>
- Lanubile, A.; Lorenzo, S.; Marocco, A. & Busconi, M. (2024) - DNA-based techniques to check quality and authenticity of food, feed and medicinal products of plant origin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 149, art. 104568. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104568>
- Manning, L. & Soon, J.M. (2016) - Food Safety, Food Fraud, and Food Defense: A Fast Evolving Literature. *Journal of Food Science*, vol. 81, n. 4, p. 823-834. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13256>
- Masoomi, S.; Sharifi, H. & Hemmateenejad, B. (2024) - A paper-based optical tongue for characterization of Iranian honey: Identification of geographical/botanical origins and adulteration detection. *Food Control*, vol. 155, art. 110052. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110052>
- Morais, S.L.; Barros, P.; Santos, M.; Delerue-Matos, C.; Gomes, A.C. & Barroso, M.F. (2021) - Electrochemical genosensor for the detection of *Alexandrium minutum* dinoflagellates. *Talanta*, vol. 222, art. 121416. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121416>
- Morales, V.; Corzo, N. & Sanz, M. (2008) - HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulteration of honey with sugar syrups. *Food Chemistry*, vol. 107, n. 2, p. 922-928. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.050>
- Orozco, J. & Medlin, L.K. (2011) - Electrochemical performance of a DNA-based sensor device for detecting toxic algae. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 153, n. 1, p. 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.10.016>

- Padovan, G.J.; De Jong, D.; Rodrigues, L. & Marchini, J.S. (2003) - Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chemistry*, vol. 82, n. 4, p. 633–636. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00504-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00504-6)
- Puscas, A.; Hosu, A. & Cimpoiu, C. (2013) - Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography A*, vol. 1272, p. 132–135. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.064>
- Ribeiro, R.O.R.; Mársico, E.T.; Carneiro, C.S.; Monteiro, M.L.G.; Júnior, C.C. & de Jesus, E.F.O. (2014) - Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance ($\text{LF}^1\text{H NMR}$). *Journal of Food Engineering*, vol. 135, p. 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.009>
- Ruiz-Matute, A.I.; Rodríguez-Sánchez, S.; Sanz, M.L. & Martínez-Castro, I. (2010) - Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 23, n. 3, p. 273–276. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.004>
- Ruiz-Matute, A.I.; Soria, A.C.; Martínez-Castro, I. & Sanz, M.L. (2007) - A new methodology based on GC MS to detect honey adulteration with commercial syrups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, n. 18, p. 7264–7269. <https://doi.org/10.1021/jf070559j>
- Santos, M.J.; Pinto, T. & Vilela, A. (2022) - Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Nutritional and Phenolic Composition Interactions with Chestnut Flavor Physiology. *Foods*, vol. 11, n. 24, art. 4052. <https://doi.org/10.3390/foods11244052>
- Se, K.W.; Ghoshal, S.K.; Wahab, R.A.; Ibrahim, R.K.R. & Lani, M.N. (2018) - A simple approach for rapid detection and quantification of adulterants in stingless bees (*Heterotrigona itama*) honey. *Food Research International*, vol.105, p. 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.012>
- Spiteri, M.; Jamin, E.; Thomas, F.; Rebours, A.; Lees, M.; Rogers, K.M. & Rutledge, D.N. (2015) - Fast and global authenticity screening of honey using $^1\text{H-NMR}$ profiling. *Food Chemistry*, vol. 189, p. 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.099>
- Šugar, J. & Bouř, P. (2016) - Quantitative analysis of sugar composition in honey using 532-nm excitation Raman and Raman optical activity spectra. *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 47, n. 11, p. 1298–1303. <https://doi.org/10.1002/jrs.4960>
- Suna, S.; Özcan-Sinir, G.; Tamer, C.E.; İncedayi, B. & Çopur, Ö.U. (2018) - Antioxidant Capacity and Physicochemical Characteristics of Carbonated *Erica Arborea* Tea Beverage. *Beverages*, vol. 4, n. 3, art. 50. <https://doi.org/10.3390/beverages4030050>
- Yang, D. & Ying, Y. (2011) - Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 46, n. 7, p. 539–560. <https://doi.org/10.1080/05704928.2011.593216>
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S. & Madden, T. (2012) -Primer-BLAST: a tool to design target specific primers for polymerase chain reaction. *BioMed Central Bioinformatics*, vol. 13, art. 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zambianchi, S.; Soffritti, G.; Stagnati, L.; Patrone, V.; Morelli, L.; Vercesi, A. & Busconi, M. (2021) - Applicability of DNA traceability along the entire wine production chain in the real case of a large Italian cooperative winery. *Food Control*, vol. 124, art. 107929. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107929>