

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

9

INDÚSTRIA,
INOVAÇÃO E
INFRAESTRUTURA



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

12

CONSUMO E
PRODUÇÃO
RESPONSÁVEIS



COMUNICADO
TÉCNICO

266

Fortaleza, CE
Agosto, 2020

Embrapa

Formulação de uma Solução Estabilizante para Estocagem de um Imunossensor Eletroquímico para Detecção de *Salmonella* sp.

Francisca Airlane Esteves de Brito
Lorena Cristina Rodrigues Bezerra
Roselayne Ferro Furtado
Maria de Fatima Borges
Terezinha Feitosa Machado
Carlucio Roberto Alves
Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Formulação de uma Solução Estabilizante para Estocagem de um Imunossensor Eletroquímico para Detecção de *Salmonella* sp.¹

¹ Francisca Airlane Esteves de Brito, engenheira de alimentos, mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE; Lorena Cristina Rodrigues Bezerra, graduanda em Química na Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE; Roselayne Ferro Furtado, bióloga, doutora em Biotecnologia pelo RENORBIO, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Maria de Fatima Borges, farmacêutica, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Terezinha Feitosa Machado, engenheira de alimentos, doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Carlucio Roberto Alves, químico, doutor em Físico-química, professor da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE; Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, química, doutora em Físico-química, professora da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE

A salmonelose é considerada uma das mais importantes enfermidades veiculadas por alimentos, e a forma de detecção do patógeno usualmente empregada é laboriosa, apresenta elevado consumo de material e dura cerca de cinco dias para resultados presuntivos. Métodos rápidos têm sido empregados visando à redução de tempo na obtenção dos resultados e utilizados em análises microbiológicas de forma prática para fins de triagem de amostras positivas.

Entre as opções de métodos rápidos, os imunossensores têm ganhado espaço sob a perspectiva de serem exatos, precisos e mais rápidos do que os métodos convencionais de análise (Azam et al., 2014; Piro; Reisberg, 2017; Félix; Angnes, 2019). Imunossensores

constituem um tipo específico de biossensor baseado em uma reação imunológica que compreende antígeno ou anticorpo como o componente biológico utilizado no reconhecimento do analito. A especificidade e seletividade envolvida na interação antígeno-anticorpo é amplamente explorada, principalmente na composição de *kits* para detecção de patógenos da área da saúde e, mais recentemente, para o desenvolvimento de imunossensores. Contudo, nos estudos até aqui desenvolvidos, observa-se uma lacuna no que se refere ao armazenamento desses dispositivos, sendo comum nos laboratórios de pesquisa a montagem do sistema seguida imediatamente da análise.

Em razão da ausência de soluções estabilizantes comerciais para imunossensores, considerando-se fins de transferência de tecnologia e comercialização, que abrange a questão de produção, armazenamento, distribuição e responsabilidade de entrega de um produto em condições ideais para a realização das análises, é importante estabelecer uma condição de estocagem do dispositivo (eletrodos) onde está imobilizado o componente biológico. Nessa perspectiva, foi formulada uma solução estabilizante para o armazenamento de um imunossensor eletroquímico para detecção de *Salmonella* sp. (Melo et al., 2016; Alexandre et al., 2018).

Montagem do imunossensor

Imunossensores eletroquímicos montados a partir da técnica de automontagem, utilizando-se eletrodos descartáveis de ouro (Dropsense®), foram imersos em solução etanólica de cisteamina 10 mM por 3 h. Na sequência, o eletrodo foi imerso em solução de N-hidroxisuccinimida/N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (Sigma-Aldrich®) (EDC/NHS) (2 mM/5 mM) contendo proteína A de *Staphylococcus aureus* por 1 h (7,5 mg mL⁻¹). Os eletrodos modificados foram imersos por 15 h em solução de anticorpo primário anti-*Salmonella* (Difco®) (75 mg mL⁻¹). Após cada etapa

de imersão, os eletrodos foram lavados com solução tampão fosfato salino (PBS) (Synth®) 10 mM (pH 7,4). Em seguida, foram imersos em solução de albumina de soro bovino (BSA) 1% (m/v) (Sigma-Aldrich®) por 1 h.

Formulação da solução estabilizante

Uma solução estabilizante foi formulada à base de PBS 1 mM, EDTA 1 mM (Synth®), Azida 0,2% (m/v) (Synth®) e BSA (Sigma-Aldrich®) 1 mM. Os imunossensores foram estocados nessa solução em condição refrigerada (4 °C) e umidade relativa de 14%. Análises em leite contaminado com o patógeno foram realizadas a cada 30 dias para determinar a validade do dispositivo.

Resposta analítica do imunossensor

O desempenho dos imunossensores, mantidos em solução estabilizante sob condição refrigerada, foi avaliado em amostras comerciais de leite integral UHT e contaminadas com *Salmonella* Typhimurium ATCC® 51812TM em laboratório na concentração de 10⁶ UFC mL⁻¹. As amostras de leite foram centrifugadas (5.000 rpm a 4 °C por 30 min) para remoção da gordura. Na sequência, o biossensor foi imerso na amostra por 1 h e incubado em solução

de anticorpo conjugado com a enzima peroxidase HRP (Sigma-Aldrich®) por 1 h.

Para as análises eletroquímicas, foi utilizado um potenciostato/galvanostato (Autolab/PGSTAT12) com o software NOVA (v.4.9). A resposta analítica para o imunossensor foi gerada a potencial constante de 75 mV por 120 s em solução tampão PBS 10 mM (pH 7,4) na presença de H_2O_2 300 mM e hidroquinona 3 mM.

Estimativa do tempo de estocagem do imunossensor

A determinação da validade dos dispositivos mantidos em solução estabilizante e sob refrigeração foi baseada no tempo em que o biossensor apresentou respostas positivas na presença de amostras de leite contaminadas com *Salmonella* (Figura 1).

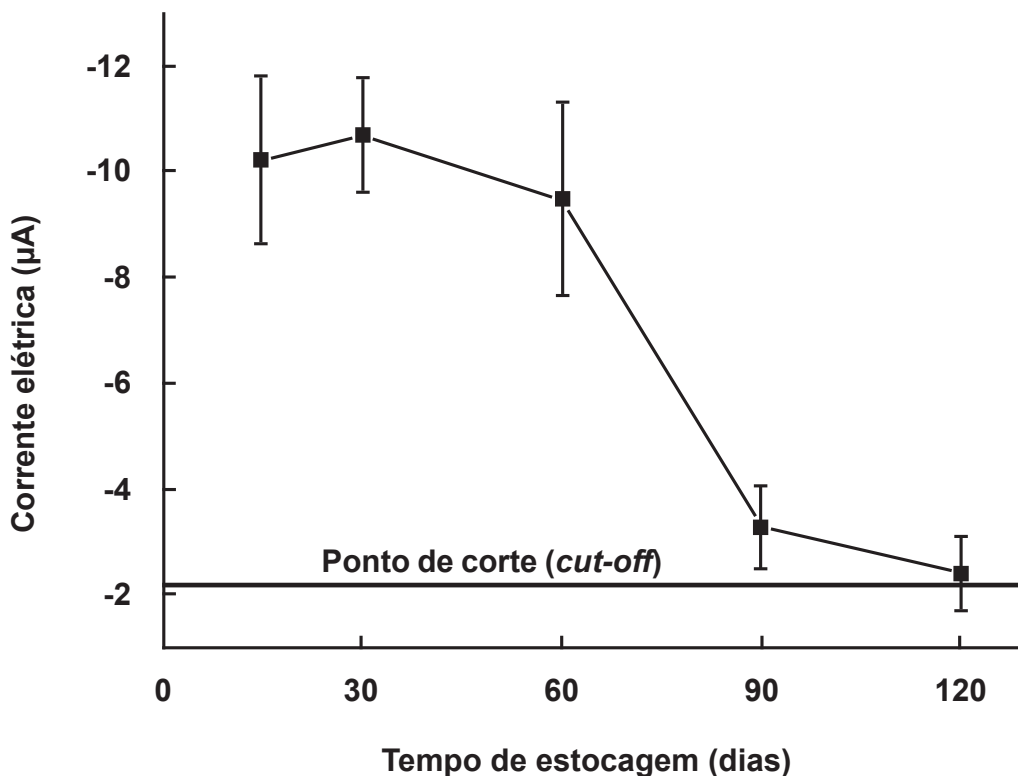


Figura 1. Resposta amperométrica do imunossensor na detecção de *S. Typhimurium*.

Para isso, foi definido um ponto de corte (*cut-off*) considerando-se $X + 3 DP$, onde X representa a média das correntes do dispositivo na ausência do patógeno e DP é o desvio padrão amostral. Um *cut-off* de $-2,2 \mu A$ foi encontrado para a amostra de leite sem o patógeno. Respostas foram consideradas positivas quando os valores de corrente elétrica situaram-se acima do *cut-off*, e respostas negativas quando apresentaram o mesmo valor ou abaixo do *cut-off*. O imunossensor apresentou sensibilidade de 10 UFC mL^{-1} de *S. Thyphimurium* no leite integral, embora em condição tamponante ele tenha apresentado sensibilidade de 1 UFC mL^{-1} (Brito, 2020). Métodos comerciais rápidos de detecção para *Salmonella* sp. apresentam sensibilidade em torno de 10^4 UFC mL^{-1} , sendo necessária uma etapa de enriquecimento para se conseguir a detecção do patógeno em concentrações menores (Lee et al., 2015; Silva et al., 2018).

Aos 90 dias de estocagem, o desempenho analítico do biossensor (mantido em solução estabilizante formulada) foi satisfatório na análise qualitativa (presença/ausência da *Salmonella*). Percebeu-se que, no decorrer do tempo, ocorreu uma redução gradativa na corrente elétrica catódica e, aos 120 dias, a resposta do biossensor foi comprometida, com resposta amperométrica igual ao valor do *cut-off*, tendo apresentado um resultado falso-negativo.

Na Tabela 1, é possível observar a redução da corrente elétrica catódica (%) em função da corrente elétrica inicial obtida com o eletrodo recém-preparado na presença de *S. Thyphimurium*. Apesar da redução de cerca de 12% para 70% aos 60 e 90 dias, respectivamente, o dispositivo, que é qualitativo, permaneceu sensível à presença da *S. Thyphimurium* na concentração de 10^6 UFC mL^{-1} .

Tabela 1. Percentual de redução de corrente elétrica catódica dos dispositivos na detecção de *S. Thyphimurium* armazenados em solução estabilizante.

Parâmetros	Tempo de estocagem (dias)				
	15	30	60	90	120
Redução da corrente elétrica (%)	4,5	5,0	11,9	69,8	77,8

Os resultados mostraram que a solução estabilizante refrigerada manteve o desempenho do biossensor por 90 dias. Sugere-se que essa solução seja avaliada na estocagem de outros biossensores, ampliando assim a sua funcionalidade. Esforços serão direcionados para uso de outros componentes na formulação da solução estabilizante que possam estender ainda mais o tempo de validade dos imunossensores.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa e ao CNPq pelo suporte financeiro, inclusive pela bolsa de mestrado de Francisca Airlane Esteves de Brito (CNPq).

Referências

- ALEXANDRE, D. L.; MELO, A. M. A.; FURTADO, R. F.; BORGES, M. F.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BISWAS, A.; CHENG, H. N.; ALVES, C. R. A rapid and specific biosensor for *Salmonella* Typhimurium detection in milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 748-756, 2018.
- AZAM, M. D. S.; RAHMAN, R. T. M. D.; LOU, Z.; TANG, Y.; RAQIB, S. M.; JOTHI, J. S. Review: advancements and application of immunosensors in the analysis of food contaminants, **Nusantara Bioscience**, v. 6, n. 2, p. 186-195, 2014.
- BRITO, F. A. E. de. **Desempenho e estabilidade de biossensor eletroquímico utilizando eletrodos descartáveis para detecção de *Salmonella* sp. em leite**. 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.
- FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors - a powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10215, p. 470-478, 2019.
- LEE, K-M.; RUNYONA, M.; HERRMANA, T. J.; PHILLIPS, R.; HSIEH, J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264-276, 2015.
- MELO, A. M. A.; ALEXANDRE, D. L.; FURTADO, R. F.; BORGES, M. de F.; ALVES, C. R.; FIGUEIREDO, E. A. T. de. **Detecção de *Salmonella* sp. em leite utilizando biossensor eletroquímico**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016. 3 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 224). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1054785>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- PIRO, B.; REISBERG, S. Recent Advances in Electrochemical Immunosenors. **Sensors**, v. 17, n. 4, p. 794, 2017.
- SILVA, N. F. D.; MAGALHÃES, M. C. S. J.; FREIRE, C.; MATOS, C. D. Electrochemical biosensors for *Salmonella*: state of the art and challenges in food safety assessment. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, p. 667-682, 2018.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici
60511-110, Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7195
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
(2020): on-line



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Secretária-executiva

Celli Rodrigues Muniz

Secretária-administrativa

Eveline de Castro Menezes

Membros

Marlos Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal

Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos Garruti,

Dheyne Silva Melo, Ana Iraidy Santa Brigida,

Eliana Sousa Ximendes, Nivia da Silva Dias

Revisão de texto

José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica

Rita de Cassia Costa Cid

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

José Cesamildo Cruz Magalhães

Foto da capa

Roselayne Ferro Furtado