



## Detecção de *Salmonella* sp. em Leite Utilizando Biossensor Eletroquímico

Aírís Maria Araújo Melo<sup>1</sup>  
Dalila Lima Alexandre<sup>2</sup>  
Roselayne Ferro Furtado<sup>3</sup>  
Maria de Fatima Borges<sup>4</sup>  
Carlucio Roberto Alves<sup>5</sup>  
Evânia Altina Teixeira de Figueiredo<sup>6</sup>

Atualmente, os métodos convencionais para detecção de *Salmonella* são considerados demorados, necessitando de, no mínimo, cinco dias para a conclusão de um diagnóstico (ANDREWS et al., 2014). Outro aspecto desfavorável para o uso desses métodos é que se faz necessária uma estrutura laboratorial específica, onerosa e com profissionais capacitados para a execução de técnicas complexas. Nesse contexto, os biossensores representam uma alternativa de resposta rápida para a detecção de bactérias patogênicas em alimentos, destacando-se os biossensores que utilizam transdutores eletroquímicos, pois podem ser miniaturizados e usados rotineiramente, a exemplo do que acontece com os glicosímetros comerciais encontrados facilmente em farmácias.

No Brasil, no período de 2000 a 2014, 7% dos surtos alimentares causados por *Salmonella* foram veiculados por leite e seus derivados (BRASIL, 2015). Sob o ponto de vista analítico, o leite é considerado uma matriz complexa devido à sua composição. A presença de lipídeos, carboidratos, proteínas complexas, antibióticos e bactérias, entre outros, pode reduzir a sensibilidade e a especificidade de métodos analíticos para análise do leite (MORTARI; LORENZELLI, 2014).

O biossensor foi desenvolvido a partir da técnica de automontagem utilizando eletrodos de ouro com área média de 0,020 cm<sup>2</sup>, sobre os quais foi inicialmente formada a monocamada de cisteamina (10 mM) e, em seguida, houve a ligação da proteína A (7,5 mg mL<sup>-1</sup>), que permitiu

<sup>1</sup> Bióloga, doutoranda do Curso de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) na Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, [airismelo@hotmail.com](mailto:airismelo@hotmail.com)

<sup>2</sup> Química pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, [Dalila\\_liale@outlook.com](mailto:Dalila_liale@outlook.com)

<sup>3</sup> Bióloga, D.Sc. em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, [roselayne.furtado@embrapa.br](mailto:roselayne.furtado@embrapa.br)

<sup>4</sup> Farmacêutica-bioquímica, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, [maria.fatima@embrapa.br](mailto:maria.fatima@embrapa.br)

<sup>5</sup> Químico, D.Sc. em Química, professora da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, [alvescr@yahoo.com](mailto:alvescr@yahoo.com)

<sup>6</sup> Bióloga, D.Sc. em Microbiologia, professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, [evanialtina@gmail.com](mailto:evanialtina@gmail.com)

a imobilização orientada do anticorpo primário anti-*Salmonella* (75 mg mL<sup>-1</sup>). O reconhecimento do antígeno foi evidenciado por meio da ligação do anticorpo secundário marcado com a enzima peroxidase, aplicando a técnica cronoamperometria (75 mV por 120 segundos). O desempenho analítico do biossensor foi avaliado para a detecção de *Salmonella* em três tipos de leite UHT desnatado, UHT integral e cru, previamente contaminados.

As amostras de leite foram inicialmente avaliadas para a presença de *Salmonella*. Adicionalmente, no leite cru, avaliou-se a presença de coliformes e quantificação de bactérias aeróbias mesófilas (possíveis interferentes por reação cruzada na resposta analítica do biossensor). Posteriormente, as amostras foram contaminadas com concentrações diferentes de *S. Typhimurium*: 10<sup>1</sup>, 10<sup>3</sup> e 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (concentrações confirmadas aplicando-se a técnica *spread-plate*). Para a análise de leite UHT desnatado, não foi necessário nenhum tipo de tratamento da amostra. O biossensor foi deixado em contato com cada amostra contaminada durante 60 minutos e, em seguida, foi lavado com tampão PBS (*phosphate buffered saline* pH 7,4). Na próxima etapa, o biossensor foi imerso em solução com anticorpo secundário marcado com peroxidase por 60 minutos e, posteriormente, lavado com tampão PBS. A resposta amperométrica foi obtida, e o biossensor foi capaz de diferenciar as amostras contaminadas das amostras controle (ausência de *Salmonella*) com limite de detecção de 10 UFC mL<sup>-1</sup> calculado com base na equação  $LOD = X + t_{(n-1, 1-\alpha)} \times SD$  (em que X é a média dos resultados das amostras controle; t é tabelado para a distribuição t de Student; SD é desvio padrão), de acordo com Inmetro (2011).

Para as análises dos tipos de leite cru e UHT integral, foi incluída uma etapa de centrifugação da amostra para remoção da gordura. Desse modo, a amostra contaminada foi inicialmente centrifugada a 5.000 rpm por 30 minutos, e o precipitado, contendo as células de *Salmonella*, foi suspenso em tampão PBS e submetido à análise pelo biossensor e também à contagem para confirmação das concentrações de *Salmonella* testadas. A partir dessa etapa, seguiu-se o mesmo procedimento adotado na análise do leite UHT desnatado. O limite de detecção do biossensor para as amostras de leite UHT integral e cru foi de 10 UFC mL<sup>-1</sup>.

Esse resultado demonstra que o tratamento das amostras de leite por meio da centrifugação foi eficiente permitindo que o biossensor apresente o mesmo desempenho nos três tipos de leite testados.

Os resultados das análises microbiológicas do leite cru, realizadas antes da etapa de contaminação com *Salmonella*, evidenciaram contagens de bactérias mesófilas e coliformes termotolerantes em ordem de 10<sup>6</sup> e 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente, e ausência de *Salmonella*. A população bacteriana presente no leite cru não interferiu na resposta analítica do biossensor. O desempenho analítico do dispositivo foi semelhante em todas as amostras de leite testadas e manteve-se em 10 UFC mL<sup>-1</sup>, confirmando se tratar de um procedimento recomendável para a detecção de *Salmonella* em leite.

Diante dos resultados apresentados, o biossensor eletroquímico desenvolvido com base na presente metodologia poderá ser aplicado como uma ferramenta alternativa para detecção mais rápida de *Salmonella* em leite. No entanto, para as amostras de leite que apresentam gordura em sua composição, como o integral e o cru, recomenda-se uma etapa de centrifugação das amostras, a fim de removê-la e evitar resultados falhos na detecção de *Salmonella*.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Processo nº 475174/2012-7) e à Embrapa (03.13.00.050.00.00) pelo suporte financeiro e à Capes pela bolsa de mestrado da aluna Airis Maria Araújo Melo.

## Referências

- ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual (BAM) online**. Silver Spring, 2014. Chap. 5. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos**. 2015. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta-o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2016.
- INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasília, DF, 2011. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf). Acesso em: 15 ago. 2016.
- MORTARI, A.; LORENZELLI, L. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: a review. **Biosens Bioelectron**, v. 60, p. 8-21, 2014

**Comunicado  
Técnico, 224**



Unidade responsável pelo conteúdo e edição:  
**Embrapa Agroindústria Tropical**  
**Endereço:** Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
**Fone:** (85) 3391-7100  
**Fax:** (85) 3391-7109 / 3391-7141  
**E-mail:** [www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

1ª edição (2016): disponibilizada on-line no  
formato PDF

**Comitê de  
Publicações**

**Presidente:** *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*  
**Secretária-executiva:** *Celli Rodrigues Muniz*  
**Secretária-administrativa:** *Eveline de Castro Menezes*  
**Membros:** *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra,  
Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim  
Martins, Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa  
Cid, Eliana Sousa Ximendes.*

**Expediente**

**Supervisão editorial:** *Sérgio César de França Fuck Júnior*  
**Revisão de texto:** *Marcos Antônio Nakayama*  
**Normalização bibliográfica:** *Rita de Cassia Costa Cid*  
**Editoração eletrônica:** *Arilo Nobre de Oliveira*