

Fortaleza, CE / Julho, 2024



Desempenho de biossensor amperométrico para detecção de *Salmonella* sp. em queijo do tipo coalho

Marília de Albuquerque Oliveira⁽¹⁾, Roselayne Ferro Furtado⁽²⁾, Terezinha Feitosa Machado⁽³⁾, Rachel Castelo Menezes⁽⁴⁾, Maria Leonia da Costa Gonzaga⁽⁵⁾ e Carlucio Roberto Alves⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Química, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. ⁽²⁾ Pesquisadora, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽³⁾ Pesquisadora, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽⁴⁾ Bióloga, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE. ⁽⁵⁾ Farmacêutica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza CE. ⁽⁶⁾ Professor, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

Resumo – *Salmonella* sp. é um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos. Essas bactérias podem contaminar os queijos durante a produção e o armazenamento. Testes rápidos para a detecção do patógeno são interessantes sob o ponto de vista prático, como uma ferramenta alternativa de triagem, haja vista que o método-padrão de análise utilizado pode levar até cinco dias. Nesse sentido, foi avaliado o desempenho de um biossensor amperométrico em amostras de queijos comerciais contaminadas intencionalmente com *Salmonella* Typhimurium. O biossensor foi montado pela técnica de monocamadas automontadas, a partir de eletrodos descartáveis modificados para imobilização de anticorpo anti-*Salmonella*. Após o contato com as amostras, o eletrodo foi colocado em contato com solução de anticorpo marcado com peroxidase para que ocorresse variação na corrente elétrica frente ao potencial aplicado quando o patógeno estivesse presente. O dispositivo teve um limite médio de quantificação (LQ) e de detecção (LOD) de 1,41 UFC mL⁻¹ e 0,35 UFC mL⁻¹, respectivamente. Na presença de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, houve variação de corrente elétrica, embora seja possível diferenciar da resposta observada na amostra contaminada com *Salmonella*. Além disso, o biossensor não apresentou sensibilidade quanto à presença de *Salmonella* Typhimurium inativa. O biossensor apresentou alta sensibilidade para o patógeno e tem potencial de uso como uma ferramenta de triagem de amostras contaminadas por *Salmonella* sp.

Termos para indexação: queijo coalho, segurança de alimentos.

Performance of an amperometric biosensor for detection of *Salmonella* sp. in coalho type cheese

Abstract – *Salmonella* sp. is one of the leading causes of foodborne illnesses. These bacteria can contaminate cheeses during production and storage. Rapid tests for pathogen detection are interesting from a practical point of view as an alternative screening tool, since the standard method of analysis used can take up to five days to give results. In this sense, the performance of an

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Pernambuco, 2.270, Pici
60.511-110 Fortaleza, CE
www.embrapa.br/agroindustria-
-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

José Roberto Vieira Junior

Secretária-executiva

Celli Rodrigues Muniz

Membros

Afrânio Arley Teles Montenegro,

Aline Saraiva Teixeira, Eveline de

Castro Menezes

Francisco Nelsieudes Sombra

Oliveira, Helenira Ellery Marinho

Vasconcelos, Kirley Marques

Canuto, Laura Maria Bruno,

Marlon Vagner Valentim Martins,

Pablo Busatto Figueiredo,

Roselayne Ferro Furtado, Sandra

Maria Morais Rodrigues

Revisão de texto

José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica

Rita de Cassia Costa Cid

(CRB-3/624)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

José Cesamildo Cruz Magalhães

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

amperometric biosensor in a sample of commercial cheese intentionally contaminated with *Salmonella* Typhimurium was evaluated in this work. The biosensor was assembled by the technique of self-assembled monolayers, from disposable electrodes modified for immobilization of anti-*Salmonella* antibody Poly A-I and Vi. After contact with the sample, the electrode was placed in contact with a peroxidase-labeled antibody solution. A variation in the electric current could occur against the electric potential applied if the pathogen was present in the sample. The device had a limit of quantification (LQ) and detection (LOD) of 0.36 CFU mL⁻¹ and 1.41 CFU mL⁻¹. In the presence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* there was a variation in electrical current, although it was possible to differentiate it from the response observed in the sample contaminated with *Salmonella*. Furthermore, the biosensor was not sensitive to the presence of inactive *Salmonella* Typhimurium. The biosensor showed high sensitivity and has potential to be used as a screening tool for samples contaminated by *Salmonella* sp.

Index terms: coalho cheese, food safety.

Introdução

Salmonella sp. é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, que cresce em temperaturas de 8 a 45 °C e pH entre 4,0 e 9,0 (Chlebicz; Śliżewska, 2018). É responsável pela salmonelose, a segunda doença transmitida por alimentos mais comum na União Europeia. A *Salmonella enterica* pode ser dividida em sete subespécies, com mais de 2.500 sorotipos reconhecidos, sendo *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium os mais frequentemente detectados em casos de salmonelose (Chlebicz; Śliżewska, 2018). Uma concentração menor do que 10 células/100 g em queijo naturalmente contaminado é o suficiente para provocar complicações no organismo humano (Ratnam; March, 1986). A regulamentação brasileira (Brasil, 2022) estabelece os critérios microbiológicos para *Salmonella* como sendo ausência em 25 gramas de produto durante sua vida de prateleira.

A detecção do patógeno-padrão é realizada por plaqueamento, que pode demorar até cinco dias; mas, para um controle das características microbiológicas de forma rotineira, podem ser adotados testes rápidos que são considerados métodos de triagem eficientes e mais rápidos do que o método-padrão, apesar do tempo de resposta ser em torno de 24 horas, dada a necessidade de etapa de

pré-enriquecimento. Esta etapa é importante para que se alcance a sensibilidade necessária para um resultado positivo do teste em baixas concentrações do patógeno na amostra. Nesse sentido, vários estudos focaram no desenvolvimento de métodos para a detecção de *Salmonella* com menor tempo de resposta para o patógeno em amostras de alimentos. Nos últimos anos, os métodos de detecção alternativos para *Salmonella* incluem cultura bacteriana (Jia et al., 2023), ELISA (Hu et al., 2018), reação em cadeia da polimerase (PCR) (Ben Has-sena et al., 2015), espalhamento Raman aprimorado na superfície (SERS) (Chuesiang et al., 2021), imunossensor eletroquímico de grafeno (Feng et al., 2022), dentre outros. No entanto, esses métodos geralmente apresentam algumas desvantagens, incluindo operação experimental demorada, equipamentos sofisticados e caros, além da necessidade de técnicos bem treinados. Portanto, há a necessidade de explorar métodos rápidos de detecção de custo competitivo, simples, de alta sensibilidade e especificidade para essas bactérias.

Trabalhos prévios da Embrapa Agroindústria Tropical com um biossensor amperométrico para detecção de *Salmonella* em amostras de leite têm mostrado que esses dispositivos podem ter alta sensibilidade sem a etapa de pré-enriquecimento da amostra (Brito et al., 2020; Melo et al., 2021; Qiu et al., 2023). Contudo, para a validação desse biossensor, é necessário realizar testes de desempenho analítico em cada um dos alimentos nos quais poderá ser aplicado. Ainda naqueles que pertencem à mesma categoria, por exemplo queijo, podem existir peculiaridades de natureza química e biológica passíveis de causar interferência na resposta analítica do dispositivo. Assim, neste trabalho, o biossensor amperométrico foi avaliado, especificamente, em amostras de queijo comerciais do tipo coalho contaminado com *S. Typhimurium* em laboratório.

Material e métodos

Amostras de queijos

Dois diferentes queijos coalho foram adquiridos em estabelecimentos comerciais em Fortaleza, Ceará, e transportados para os laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical.

Análises físico-químicas

Alíquotas de 25 g de cada queijo coalho foram adicionadas a 50 mL de tampão fosfato salino

(PBS) 10 mM, pH 7,4 e homogeneizadas em um *stomacher* (300 rpm/10 minutos). O material foi então centrifugado duas vezes a $15.303 \times g$, a 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante foi separado e filtrado (pré-tratamento da amostra) para a realização das seguintes análises físico-químicas: determinação de pH, em pHmetro; acidez titulável em titulador automático; teor proteico pelo método Dumas utilizando um analisador de nitrogênio e proteína; e teor lipídico pelo método Bligh and Dyer (Smedes; Thomasen, 1996).

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas das amostras de queijos comerciais foram realizadas de acordo com protocolos oficiais para *Salmonella* Typhimurium (Andrews et al., 2023), *Staphylococcus aureus* (Tallent et al., 2019) e *Escherichia coli* (Feng et al., 2020). A análise de coliformes seguiu a metodologia do número mais provável (NMP), enquanto o teste de *Salmonella* envolveu o crescimento em meio ágar seletivo até a série bioquímica (Silva et al., 2021).

Culturas bacterianas

As cepas de *Salmonella* Typhimurium ATCC 51812 foram cultivadas em caldo BHI a 37°C por 24 horas. A dispersão bacteriana resultante de concentração desconhecida foi centrifugada a $3,826 \times g$ por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram lavados com tampão PBS estéril 10 mM pH 7,4 e, com o mesmo tampão, foram preparadas suspensões bacterianas nas concentrações de 10 a 10^7 UFC mL^{-1} pelo método turbidimétrico de McFarland. As concentrações foram confirmadas por contagem em placas.

Para contaminação das amostras de queijo coalho comercial com concentrações conhecidas de *S. Typhimurium*, foi realizada a diluição seriada da cultura bacteriana. Uma alíquota de 100 μL de cada concentração bacteriana foi retirada e adicionada em 2 mL da dispersão de amostra pré-tratada de queijo (25 g em 225 mL de tampão PBS).

Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Escherichia coli* ATCC 4157 foram também usadas para os ensaios de especificidade do biossensor em amostras de queijos intencionalmente contaminadas com concentração de 10 UFC mL^{-1} das bactérias, utilizando-se a mesma metodologia reportada para *Salmonella* Typhimurium.

A investigação de *Salmonella* Typhimurium inativa ocorreu na concentração de 10 UFC mL^{-1} em tampão PBS 10 mM pH 7,4. A dispersão passou por processo de pasteurização lenta a 65°C

durante 30 minutos, a fim de também ser avaliada pelo biossensor.

Purificação e marcação do anticorpo com peroxidase

Os anticorpos foram purificados por precipitação de soro polivalente anti-*Salmonella* Poli A-I e Vi com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, considerando-se 45% de saturação da solução. O soro foi mantido sob agitação por 30 minutos, seguido de repouso por 24 horas, sob refrigeração, sendo posteriormente centrifugado a $15.303 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O precipitado (anticorpos) foi dialisado contra tampão PBS 10 mM, pH 7,4 por 24 horas. Após a diálise, a concentração dos anticorpos foi determinada em espectrofotômetro digital UV.

A conjugação do anticorpo com a enzima peroxidase-HRP foi realizada pelo método de Avrameas (1969), usando uma relação de 1:3 (m/m), com dissolução da enzima HRP na solução de anticorpo primário em um volume de 10 mL de tampão PBS (10 mM), seguida pela adição de 2 μL de glutaraldeído a 25% (v/v).

Preparo da solução de proteína A

Uma solução de N-hidroxisuccinimida 5 mM e N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida 2 mM (NHS/EDC) foi preparada em PBS e deixada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, foi adicionada Proteína A ($7,5 \text{ mg mL}^{-1}$) ao NHS/EDC e a solução (prot A) permaneceu em temperatura ambiente por uma hora.

Montagem do biossensor

Eletrodo descartável, contendo dois eletrodos, um de trabalho (4 mm de diâmetro) e outro auxiliar, ambos à base de tinta de ouro, e um eletrodo de referência à base de tinta de prata, foi imerso em uma célula eletroquímica de 10 mL de volume com solução etanólica de cisteamina 10 mM por três horas. Em seguida, o eletrodo foi imerso na solução protA por uma hora e denominado eletrodo cis-protA modificado. Na sequência, o eletrodo foi lavado com PBS e imerso por 12 horas em uma solução de anti-*Salmonella* 2 mg mL^{-1} . Após lavagem com PBS, o eletrodo foi incubado por uma hora com solução de BSA a 1% (p/v) para evitar a formação de ligações inespecíficas. Neste trabalho, biossensores recém-preparados e mantidos em tampão PBS foram usados nas análises eletroquímicas. Para tempos superiores a 24 horas de armazenamento dos biossensores, recomenda-se o preparo de soluções de estocagem de acordo com Brito et al. (2020).

Aplicação e resposta analítica do biossensor

O biossensor foi mantido em contato com a amostra de queijo pré-tratada por uma hora e, após lavagem com PBS, foi imerso em solução anti-*Salmonella*-HRP por uma hora.

Os testes de resposta amperométrica foram realizados na célula eletroquímica contendo PBS, peróxido de hidrogênio 300 mM e hidroquinona 3 mM. A resposta foi determinada polarizando o eletrodo de ouro a -75 mV até que uma linha de base estável (estado estacionário) fosse alcançada em 120 s. Todas as medições eletroquímicas foram executadas em temperatura ambiente e realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato e o seu software para saída dos dados.

Resultados e discussão

Análise microbiológica do queijo comercial

Primeiramente, foram realizadas análises microbiológicas das amostras de queijo coalho comerciais (QC1 e QC2) adquiridas, haja vista o produto estar propício à contaminação por patógenos durante a sua produção, pois envolve várias etapas de manipulação (Al-Nabulsi et al., 2021). Os resultados das análises para ambas as amostras de queijo foram de *S. aureus* < 100 UFC g⁻¹

e ausência de *Salmonella* em 25 g. A detecção de *E. coli* apresentada foi dentro do padrão legal aceitável (< 1.100 NMP g⁻¹) (Brasil, 2022).

Pré-tratamento das amostras

As amostras de queijo foram submetidas a um pré-tratamento para eliminar possíveis interferências durante a análise cronoamperométrica do imunossensor. Esses interferentes podem ser lipídios e/ou proteínas, bem como moléculas provenientes do processo de proteólise e lipólise que podem ocorrer naturalmente em queijos (Silva et al., 2012). A Tabela 1 apresenta os resultados das análises físico-químicas do queijo antes e após a etapa de pré-tratamento dos queijos.

O pré-tratamento da amostra foi capaz de remover grande quantidade de proteínas e lipídeos que poderiam interferir na resposta analítica. O teor de lipídios no leite também influenciou negativamente as medidas cronoamperométricas do biossensor durante a investigação de *Salmonella* (Melo et al., 2021; Brito et al., 2022); assim, uma vez que o leite é a matéria-prima para a produção de queijo, houve a preocupação em remover os lipídios desse alimento também. O conteúdo lipídico remanescente na amostra após pré-tratamento, entre 0,3 e 0,6 mg/mL (Tabela 1), não prejudicou a resposta amperométrica.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos das amostras dos queijos QC1 e QC2 antes e após a etapa de pré-tratamento.

Amostra	Umidade (%)	Amostra de queijo (antes do pré-tratamento)				Amostra de queijo (após o pré-tratamento)			
		Acidez total mol L ⁻¹	Proteína mg 100g ⁻¹	pH	Lipídeos mg 100g ⁻¹	Acidez total mol L ⁻¹	Proteína mg 100g ⁻¹	pH	Lipídeos mg 100g ⁻¹
QC1	41,37±1,1	0,021±0,004	20,91±0,4	5,1	20,86±1,0	0,009±0,001	0,419±0,03	7,3	0,290±0,001
QC2	46,28±3,0	0,022±0,008	17,31±0,4	5,5	20,67±5,3	0,007±0,001	0,223±0,2	7,0	0,630±0,007

QC1 e QC2: códigos de marcas comerciais de queijo coalho.

As amostras de queijo QC1 e QC2 foram consideradas de média e alta umidade, respectivamente. Queijos de média umidade, geralmente conhecidos como queijos de massa semidura, possuem valores entre 36,0 e 45,9%; e queijos de alta umidade, geralmente conhecidos como de massa branda ou “macios”, possuem umidade entre 46,0 e 54,9% (Brasil, 1996). Observou-se que as amostras de queijo QC1 e QC2 tiveram valores de pH em torno de 5 e acidez titulável de aproximadamente 0,02 mg mL⁻¹, sendo que, após o pré-tratamento da amostra, os

valores de pH ficaram em torno de 7 e a acidez titulável ficou em 0,009 mg mL⁻¹. A acidez titulável está diretamente relacionada com o pH, valores de acidez mais altos foram associados a pHs baixos. Assim, percebe-se que após o pré-tratamento houve a remoção de componentes ácidos presentes na amostra, tais como ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico e ácido fórmico, além de lactose e ácidos graxos com cadeias carbônicas variando de C4 a C18 (Matera et al., 2018; Margalho et al., 2021).

Na Figura 1, está evidenciada a eficiência do pré-tratamento, observando que o sinal elétrico do biossensor montado e testado em amostra pré-tratada teve um sinal elétrico de $-23,00 \mu\text{A}$; para o biossensor montado com amostra de queijo sem pré-tratamento, a corrente elétrica foi de $-0,25 \mu\text{A}$, confirmando que a presença de lipídios e outros componentes podem influenciar o sinal do dispositivo.

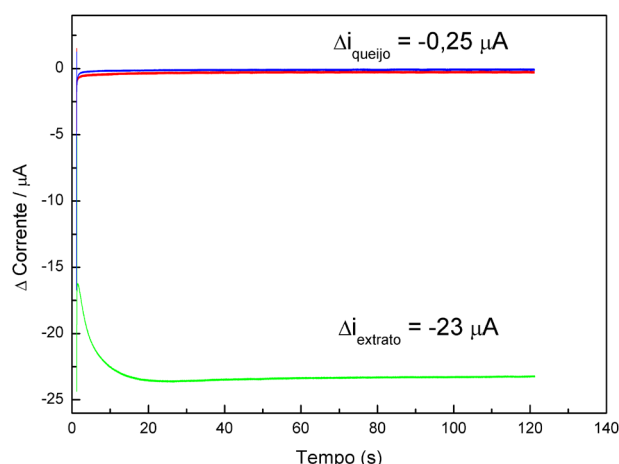


Figura 1. Comparativo do sinal elétrico dos sensores com a presença de *Salmonella* 10 UFC mL^{-1} em queijo sem e com pré-tratamento. O delta da corrente elétrica (Δi) é caracterizado pela diferença entre o biossensor lido em tampão fosfato 10 mM sem a presença de *Salmonella* (—) e o biossensor com queijo sem pré-tratamento (—) e após o pré-tratamento (—) na presença de *Salmonella* em solução contendo hidroquinona e peróxido de hidrogênio nas concentrações de 3 mM e 300 mM , respectivamente.

Desempenho do biossensor

Presença de *Salmonella* inativa

O desempenho do biossensor foi testado na presença do patógeno e do patógeno inativo (desnaturado) em condições tamponantes. Quanto maior a corrente de redução, maior o sinal amperométrico do dispositivo. Foi observada uma queda na resposta amperométrica na concentração de 10 UFC mL^{-1} de *Salmonella* inativa quando comparada à resposta com *Salmonella* ativa na mesma concentração (Figura 2). Sabe-se que a grande maioria dos sorotipos de *Salmonella* importantes epidemiologicamente apresenta motilidade, o que favorece a interação com o anticorpo imobilizado no biossensor em meio estático. Após a pasteurização, a bactéria com suas proteínas desnaturadas precipita no meio, e por isso as reações bioquímicas resultantes da interação patógeno-anticorpo não acontecem.

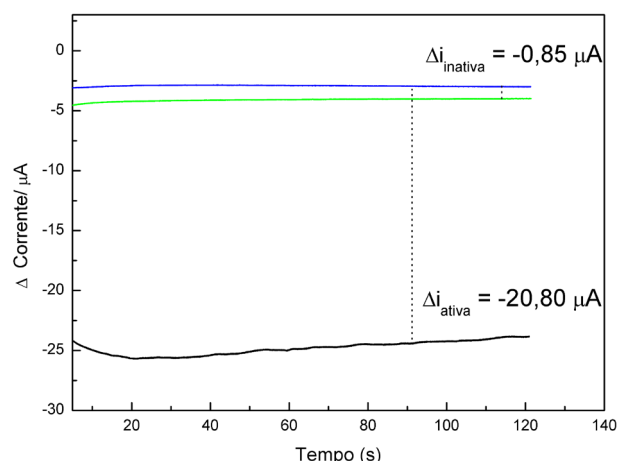


Figura 2. Comparativo do sinal elétrico dos sensores com *S. Typhimurium* ativa e inativa. O delta da corrente elétrica (Δi) é caracterizado pela diferença de corrente elétrica da resposta do biossensor sem *Salmonella* em tampão fosfato 10 mM (—) e do biossensor com *Salmonella* ativa (—) e inativa (—) na concentração de 10 UFC mL^{-1} , na presença de hidroquinona 3 mM e peróxido de hidrogênio 300 mM .

A capacidade do biossensor em diferenciar as formas inativas e ativas da *Salmonella* é uma grande vantagem desse dispositivo frente a outros métodos alternativos de detecção, como o de reação em cadeia da polimerase (PCR), que não faz essa diferenciação, uma vez que é baseada na replicação do DNA do microrganismo, independentemente da bactéria estar ativa ou inativa.

Presença de *Salmonella* no queijo

O desempenho de um biossensor, a exemplo de outros dispositivos e métodos analíticos, pode sofrer influência de compostos químicos presentes na matriz alimentar, além de outros fatores, como pH e temperatura. Assim, foram realizados testes para avaliar o desempenho do biossensor em amostras de queijos comerciais com a sua microbiota natural e contaminado em laboratório com *Salmonella*. A construção da curva de resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (Figura 3) permitiu estabelecer uma relação entre o sinal de corrente (μA) e a concentração do analito (UFC mL^{-1}). Devido à sua matriz complexa, mesmo após o pré-tratamento, as amostras de queijo apresentaram curvas distintas (Figura 3 a,b) para as mesmas concentrações de *S. Typhimurium*. Assim, do ponto de vista prático, para um desempenho quantitativo, considerando-se a composição química peculiar de cada queijo, recomenda-se uma curva de calibração para cada lote. Considerando-se que a Instrução Normativa nº

161, de 6 de julho de 2022 (Brasil, 2022), estabelece ausência de *Salmonella* em amostras de queijos, um comportamento qualitativo do biossensor para presença e ausência do patógeno já seria suficiente para verificar se as amostras estão cumprindo o padrão microbiológico estabelecido pela legislação.

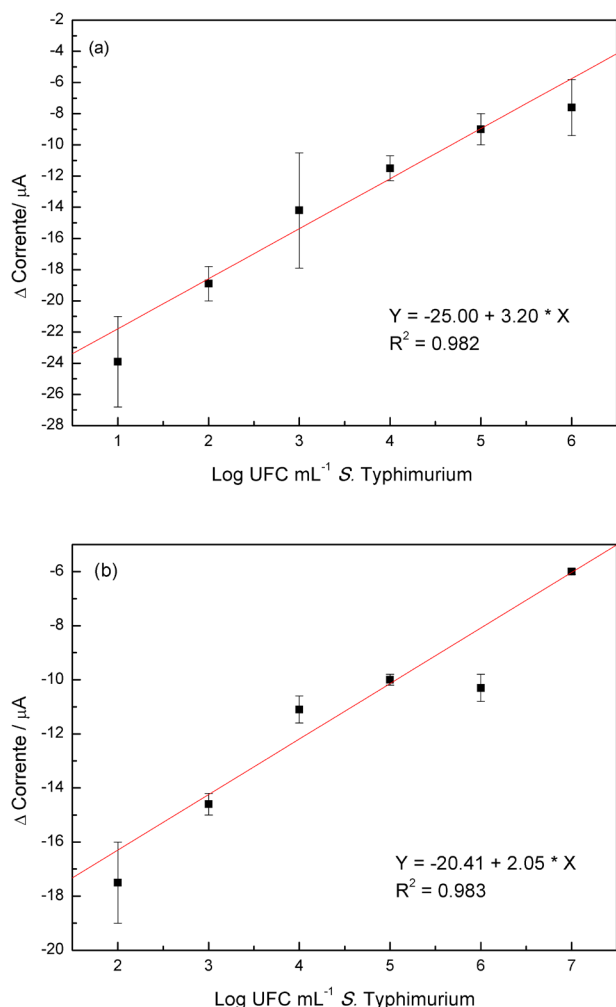


Figura 3. Curva de calibração para amostras de queijo coalho de duas diferentes marcas: (3a) QC1 e (3b) QC2.

O biossensor foi capaz de distinguir claramente as diferentes concentrações de *Salmonella* ($p < 0,05$). O limite de detecção (LOD) do dispositivo foi determinado a partir da curva analítica obtida através da equação da reta nas Figuras 3a e 3b, considerando-se a equação 1, em que y_B é o coeficiente linear da curva analítica e S_B é o desvio-padrão do branco (Inmetro, 2017).

$$LOD = y_B + 3S_B$$

O LOD encontrado do biossensor para *Salmonella* em amostras de queijos QC1 e QC2

foi de 0,43 e de 0,27 UFC mL⁻¹, respectivamente. Em outros estudos realizados com biossensores para detecção do patógeno, o LOD foi de 10 UFC mL⁻¹ em leite para um dispositivo também amperométrico (Melo et al., 2021) e de 5 UFC mL⁻¹ em amostras de leite desnatado utilizando-se um dispositivo do tipo magnético (enzimas ligadas a microesferas magnéticas) (Ding et al., 2023). Esses últimos autores obtiveram uma curva de calibração muito semelhante à deste estudo, em que a linearidade ficou entre 10² e 10⁸ UFC mL⁻¹ da bactéria.

O limite de quantificação (LQ) encontrado foi de 1,56 e de 1,26 UFC mL⁻¹ para amostras de queijos QC1 e QC2, respectivamente. O LQ foi determinado a partir da curva analítica, utilizando-se a equação 2, que relaciona razão entre o desvio-padrão do branco (S) e o coeficiente angular da curva de calibração (b) com o sinal de ruído, que geralmente é de 10:1 (Inmetro, 2017; Nelsen, 2023).

$$LQ = \frac{10 \times S}{b}$$

Os imunossensores amperométricos têm sido considerados uma versão mais moderna do ELISA (Nowak et al., 2007). A detecção por ELISA para *Salmonella* spp. teve um limite de quantificação entre 10⁴ e 10⁵ UFC mL⁻¹ (Ding et al., 2023). No teste de RT-PCR, apesar do baixo limite de detecção, < 10¹ UFC mL⁻¹, detecta-se até *Salmonella* morta, pois o princípio de detecção dessa técnica está ligado ao DNA do patógeno, podendo haver diagnóstico falso-positivo para *Salmonella* (McGuinness et al., 2012). Diferentemente da PCR e de outros métodos, o biossensor apresentado neste trabalho é capaz de diferenciar o patógeno ativo do mesmo microrganismo inativo. Outro aspecto importante desse biossensor é o tempo de análise, que dura cerca de três horas, incluindo o pré-tratamento da amostra. Isso significa um ganho significativo de tempo em relação aos métodos de detecção do mercado, que duram no mínimo 24 horas (Cox et al., 2020). Esse maior tempo demandado para os testes rápidos comerciais de detecção de *Salmonella* ocorrem devido à etapa de pré-enriquecimento, em que a amostra é colocada em meio enriquecido com nutriente por cerca de 24 horas para que ocorra um aumento no número de microrganismos. Somente após o aumento da concentração do patógeno, o nível de detecção do método é alcançado. Sendo assim, para esses métodos, a etapa de pré-enriquecimento é crucial para a detecção do patógeno em amostras com baixa concentração do microrganismo. Diferentemente, o biossensor apresentado neste trabalho não precisa

dessa etapa de pré-enriquecimento para aumento do número de patógenos presentes na amostra.

Especificidade

A especificidade do biossensor proposto foi avaliada em queijos contaminados por *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa) na concentração de 10 UFC mL⁻¹. De acordo com a Figura 4, percebe-se que há alteração de corrente elétrica nas amostras contaminadas, sendo menor para amostras com *S. aureus* e *E. coli* e maior nas amostras contaminadas por *Salmonella*. Assim, observou-se que na presença de *S. aureus* e *E. coli* houve variação de corrente elétrica, embora seja possível diferenciar da resposta observada na amostra contaminada com *Salmonella*. Considerando-se que as amostras comerciais de queijo apresentam composição química peculiar, recomendam-se estudos de validação com uma maior quantidade de marcas de queijo, o que certamente reduzirá o desvio-padrão encontrado e auxiliará na definição de um valor de corrente elétrica específico para que as amostras sejam classificadas como positivas ou negativas quanto à presença de *Salmonella*. Métodos rápidos são considerados apenas testes de triagem; caso a amostra tenha um resultado positivo, esta deverá seguir a metodologia convencional de plaqueamento a fim de confirmar a presença de *Salmonella*.

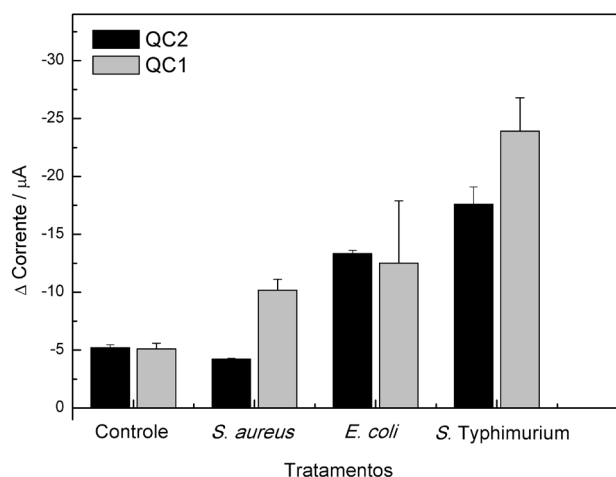


Figura 4. Análise de especificidade das amostras de queijo QC1 (amostra de queijo coalho comercial 1) e QC2 (amostra de queijo coalho comercial 2) contaminadas individualmente com *S. Typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 10 UFC mL⁻¹.

Conclusões

O biossensor desenvolvido pode ser uma alternativa aos testes rápidos disponíveis no mercado para detecção da presença de *Salmonella* em queijos, com a vantagem de ter um tempo de resposta de três horas. É necessário um pré-tratamento das amostras de queijo para remoção de interferentes a fim de se conseguir uma resposta analítica na presença de *Salmonella*. O biossensor amperométrico teve um comportamento quantitativo na faixa de concentração do patógeno testada; mas, devido à variação de composição química entre as marcas de queijos coalho, recomenda-se, caso seja de interesse estimar a concentração do patógeno, estabelecer uma curva-padrão para cada marca de queijo. Contudo, especificamente para o caso da *Salmonella*, o dispositivo pode ser qualitativo, determinando apenas presença ou ausência do patógeno.

Agradecimentos

Ao CNPq pelos recursos recebidos no projeto de nº 408599/2018-9 e pela bolsa de produtividade/CNPq referente ao trabalho.

Referências

- AL-NABULSI, A. A.; OSAILI, T. M.; OQDEH, S. B.; OLAIMAT, A. N.; JARADAT, Z. W.; AYYASH, M.; HOLLEY, R. A. Antagonistic effects of *Lactobacillus reuteri* against *Escherichia coli* O157:H7 in white-brined cheese under different storage conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 2719-2734, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19308>.
- ANDREWS, W. H.; WANG, H.; JACOBSON, A.; BEILEI, G.; ZHANG, G.; HAMMACK, T. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. Chapter 5: *Salmonella*. Silver Spring: Food and Drug Administration, 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/178914/download?attachment>. Acesso em: 08 nov. 2023.
- AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. **Immunochemistry**, v. 6, n. 1, p. 43-52, 1969. DOI: [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(69\)90177-3](https://doi.org/10.1016/0019-2791(69)90177-3).
- BEN HASSENA, A.; BARKALLAH, M.; FENDRI, I.; GROSSET, N.; BEN NEILA, I.; GAUTIER, M.; GDOURA, R. Real time PCR gene profiling and detection of *Salmonella* using a novel target: The *siiA* gene. **Journal of Microbiological Methods**, v. 109, p. 9-15, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.018>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa, nº 161, de 1º de julho de 2022. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1º de julho de 2022.

BRITO, F. A. E. de; BEZERRA, L. C. R.; FURTADO, R. F.; MELO, A. M. A.; OLIVEIRA, M. de A.; ALVES, C. R.; MACHADO, T. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. de. Pre-Collaborative Validation of an Amperometric Immunosensor for *Salmonella*. **Proceedings**, v. 60, n. 1, p. 43, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/iecb2020-07031>.

BRITO, F. A. E. de; FURTADO, R. F.; BEZERRA, L. C. R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; MELO, A. M. A.; ALVES, C. R.; CHENG, H. N.; BISWAS, A. Effect of time and storage condition on the performance of an electrochemical immunosensor for *Salmonella*. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.91621>.

CHLEBICZ, A.; ŚLIŻEWSKA, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 5, p. 863, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>.

CHUESIANG, P.; RYU, V.; SIRIPATRAWAN, U.; MCLANDSBOROUGH, L.; HE, L. Investigation of factors that impact the label-free surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the detection and discrimination of *Salmonella* Enteritidis. **LWT**, v. 150, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111962>.

COX, N. A.; BERRANG, M. E.; HOUSE, S. L.; HINTON Jr., A.; LINE, J. E.; WIGGINS, L. T. Detection of multiple naturally occurring *Salmonella* serotypes from commercial broiler carcasses with conventional methods. **Journal of Food Safety**, v. 40, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12761>.

DING, Y.; HUANG, C.; ZHANG, Y.; WANG, J.; WANG, X. Magnetic microbead enzyme-linked immunoassay based on phage encoded protein RBP 41-mediated for rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food matrices. **Food Research International**, v. 163, p. 112-212, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112212>.

FENG, K.; LI, T.; YE, C.; GAO, X.; YUE, X.; DING, S.; DONG, Q.; YANG, M.; HUANG, G.; ZHANG, J. A novel electrochemical immunosensor based on Fe₃O₄@graphene nanocomposite modified glassy carbon electrode for rapid detection of *Salmonella* in milk.

Journal of Dairy Science, v. 105, n. 3, p. 2108-2118, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21121>.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. **BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**. Silver Spring: Food and Drug Administration, 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>. Acesso em: 08 nov. 2023.

HU, J.; HUANG, R.; WANG, Y.; WEI, X.; WANG, Z.; GENG, Y.; JING, J.; GAO, H.; SUN, X.; DONG, C.; JIANG, C. Development of duplex PCR-ELISA for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 154, p. 127-133, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.10.017>.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Brasília, DF, 2017. (DOQ-CGCRE-089 – Microbiologia). Disponível em: http://inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaio. Acesso em: 14 jun. 2024.

JIA, K.; XIAO, R.; LIN, Q.; GOU, H.; PENG, J.; LIANG, Y.; SHEN, H.; CAI, M.; LIAO, M.; ZHANG, J.; HAN, Y. RNase H2 triggered visual loop-mediated isothermal amplification combining smartphone assisted all-in-one aptamer magnetic enrichment device for ultrasensitive culture-independent detection of *Salmonella* Typhimurium in chicken meat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 380, p. 133-399, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133399>.

MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; PIMENTEL, T. C.; BALTHAZAR, C. F.; ARAUJO, J. V. A.; SILVA, R.; CONTE-JUNIOR, C. A.; RAICES, R. S. L.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. A large survey of the fatty acid profile and gross composition of Brazilian artisanal cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 101, p. 103955, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2021.103955>.

MATERA, J.; LUNA, A. S.; BATISTA, D. B.; PIMENTEL, T. C.; MORAES, J.; KAMIMURA, K. A.; FERREIRA, M. V. S.; SILVA, H. L. A.; MATHIAS, S. P.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q.; RAICES, R. S. L.; QUITÉRIO, S. L.; SANT'ANA, A. S.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. **Food Research International**, v. 108, p. 18-26, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.03.014>.

MCGUINNESS, S.; BARRY, T.; O'GRADY, J. Development and preliminary validation of a real-time RT-PCR based method targeting tmRNA for the rapid

and specific detection of *Salmonella*. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 989-992, 2012.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.08.012>.

MELO, A. M. A.; FURTADO, R. F.; BORGES, M. de F.; BISWAS, A.; CHENG, H. N.; ALVES, C. R. Performance of an amperometric immunosensor assembled on carboxymethylated cashew gum for *Salmonella* detection. **Microchemical Journal**, v. 167, p. 106-268, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106268>.

NELSEN, T. C. **Probability and Statistics for Cereals and Grains**: A guide to measuring and analysis. Rio de Janeiro: Elsevier, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91724-7.00009-5>.

NOWAK, B.; VON MÜFFLING, T.; CHAUNCHOM, S.; HARTUNG, J. *Salmonella* contamination in pigs at slaughter and on the farm: A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 259-267, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.045>.

QIU, S.; LIU, B.; LENG, Y.; FOX, E.; ZHOU, X.; YAN, B.; SANG, X.; LONG, L.; HE, X.; YUAN, J.; FARRELL, G.; WU, Q. A label-free fiber ring laser biosensor for ultrahigh sensitivity detection of *Salmonella* Typhimurium. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 234, p. 115-337, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115337>.

RATNAM, S.; MARCH, S. B. Laboratory studies on *Salmonella*-contaminated cheese involved in a major outbreak of gastroenteritis. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, n. 1, p. 51-56, 1986.

SILVA, N.; LAMANAKA, B. T.; OKAZAKI, M. M.; TANIWAKI, M. H.; SILVEIRA, N. F. A.; GOMES, R. A. R.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água**. 6. ed. São Paulo: Bluncher, 2021. v. 1.

SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal "Coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1533-1538, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058>.

SMEDES, F.; THOMASEN, T. K. Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 8-9, p. 681-688, 1996. DOI: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X\(96\)00079-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0025-326X(96)00079-3).

TALLENT, S. M.; BENNETT, R. W.; HAIT, J. M. **Staphylococcus aureus**. Silver Spring: Food and Drug Administration, 2019. Chapter 12. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>. Acesso em: 08 nov. 2023.