



Desenvolvimento de um Imunossensor baseado em Tinta de Carbono para Detecção de Enterotoxina Estafilocócica

Roselayne Ferro Furtado¹
Maria de Fátima Borges¹
Maria Gardenny Ribeiro Pimenta-Martins¹
Carlucio Roberto Alves¹
Rosa Fireman Dutra¹
Luiz Guilherme Dias Heneine¹
Ricardo Souza Dias¹

Enterotoxinas estafilocócicas (ES) são uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, produzidas por *Staphylococcus aureus*. Apresentam baixo peso molecular (26-30 kDa), são estáveis ao calor e não são hidrolisadas pelas proteases do intestino (LE LOIR et al., 2003; OMOE et al., 2005), o que as torna bastante resistentes ao processamento e armazenamento de alimentos e às condições do sistema digestivo. Foram identificados mais de 20 tipos de enterotoxinas (LARKIN et al., 2009), sendo as clássicas (ESA, ESB, ESC, ESD, ESE) as de maior prevalência em produtos lácteos, especialmente em queijos (BORGES et al., 2012), envolvidos ou não em surtos e casos esporádicos de intoxicação.

As técnicas tradicionais, tais como o radioimunoensaio, ensaio de fluorescência de anticorpo marcado e ensaio imunoenzimático (ELISA), são amplamente utilizadas para a detecção de ESB. No entanto, essas técnicas envolvem procedimentos demorados, equipamentos caros e até marcadores biológicos nocivos. De importância similar, os testes rápidos para detecção de ESB são práticos e sensíveis; contudo, geralmente são importados e possuem um custo elevado por análise. Uma tendência para o monitoramento de agentes biológicos e contaminantes de alimentos é o emprego de novos métodos que apresentem resposta analítica rápida, sensíveis, de baixo custo e resultem em uma tecnologia portátil (PIMENTA-MARTINS et al., 2012).

¹Bióloga, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, roselayne.furtado@embrapa.br

²Farmacêutica, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, maria.fatima@embrapa.br

³Bióloga, doutora em Biotecnologia, professora da Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas, BA, gardennyrp@yahoo.com

⁴Químico, doutor em Química, professor da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, alvescr@yahoo.com

⁵Engenheira elétrica, professora da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, rfiremandutra@yahoo.com.br

⁶Biólogo, PhD. em Imunologia, pesquisador da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, heneinel@funed.mg.gov.br

⁷Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, ricardo.dias@funed.mg.gov.br

Os biossensores eletroquímicos são métodos de análise eficazes para a detecção de analitos (substâncias de interesse) em diferentes tipos de amostras, incluindo alimentos. São baseados na especificidade de moléculas biológicas como anticorpos e enzimas imobilizadas na superfície do transdutor e na sensibilidade analítica das técnicas eletroquímicas. Os biossensores eletroquímicos que utilizam tecnologia de eletrodo impresso têm sido aplicados com sucesso para detecção de microrganismos patogênicos e suas toxinas (DOMINGUEZ-RENEDO et al., 2007; YANG et al., 2010).

A tecnologia para a preparação de eletrodos impressos (EI) é simples, de baixo custo, versátil e também adequada para a produção em massa de eletrodos descartáveis. Os EI são produzidos por impressão de tintas condutoras, especialmente de carbono sobre um suporte inerte. Nesse caso, eles são chamados de eletrodos impressos de carbono (EIC). O uso de tintas de carbono é particularmente atrativo para a produção de eletrodos impressos (devido ao seu baixo custo, baixas correntes de fundo e uma janela ampla de potencial de trabalho para os dispositivos eletroquímicos). Para a imobilização de biomoléculas, os eletrodos descartáveis têm a superfície modificada com substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo o uso de nanopartículas. Nanopartículas condutoras, tais como ouro, prata, e nanotubos de carbono, conferem maior área superficial para imobilização de moléculas biológicas e são importantes para melhorar a transferência de elétrons envolvidos na reação bioquímica do biossensor, resultando em maior sensibilidade do método (PINGARRÓN et al., 2008; HUANG et al., 2010).

A possibilidade de miniaturizar o imunossensor (biossensor cuja molécula biológica sensora é anticorpo) para enterotoxina estafilocócica B (ESB), usando um elemento transdutor descartável, tais como EIs, é uma importante perspectiva para o desenvolvimento comercial de um dispositivo amperométrico portátil para detecção de enterotoxina B de estafilococos (ESB). Neste trabalho, são apresentados os resultados inerentes ao desenvolvimento de um imunossensor para enterotoxina B de estafilococos (ESB) utilizando eletrodos impressos de tinta de carbono com nanopartículas de ouro.

Construção do biossensor

Os EICs foram preparados em laboratório pela técnica de *casting* com tinta de carbono (Electrodag® PF 407-C) e nanopartícula de ouro (suspensão coloidal de nanopartículas de ouro). O EIC preparado teve área geométrica de 9,62 mm² e foi curado por 60 minutos a 60 °C. Primeiramente, os EICs foram pré-tratados em solução de KCl 0,1 M submetendo 20 ciclos de varreduras de voltametria cíclica na janela de potencial entre 2 V e -2 V, sob uma velocidade de varredura 0,1 V s⁻¹ para ativação da superfície (ALONSO-LOMILLO et al., 2009). A seguir, foram imersos em solução de cisteamina 10 mM por 2 horas à temperatura ambiente, lavados com etanol e água e secos à temperatura ambiente para a próxima etapa. Uma solução de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) 2 mM/ 5 mM foi preparada em tampão acetato pH 5,0, deixada reagir por 15 minutos e então adicionada de 5 mg mL⁻¹ de proteína A extraída de *S. aureus* para reação por 30 minutos. Finalmente, o eletrodo modificado foi incubado em solução de anticorpos policlonais contra ESB (100 mg mL⁻¹) por 1 hora. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com 10 µL de BSA 1% gotejado sobre EIC por 1 hora à temperatura ambiente. Após cada etapa, EIC foi lavado com tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline* – PBS) 10 mM e água destilada. O desempenho do biossensor foi avaliado após a adição de 10 µL de ESB (1 mg L⁻¹, pH 7,4) por 1 hora. As medidas de voltametria de pulso diferencial foram realizadas em tampão PBS 50 mM (pH 7,4) contendo K₃Fe(CN)₆ 4 mM em temperatura ambiente. As medidas foram obtidas na janela de potencial de -0,2 V a 0,6 V com amplitude de pulso de 0,075 V e comprimento do pulso de 75 ms. As medidas de voltametria cíclica foram conduzidas em KCl 50 mM e K₃Fe(CN)₆ 4 mM com velocidade de varredura de 0,050 V s⁻¹.

Desempenho da resposta do biossensor na detecção de enterotoxinas

A resposta analítica do biossensor, incubado em diferentes concentrações de ESB em tampão PBS pH 7,4 está diretamente relacionada com a diminuição do fluxo de elétrons do composto

redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ para a superfície eletródica, em função da interação com as enterotoxinas. A resposta do biossensor apresentou uma boa linearidade até a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de calibração de 0,98 ($P < 0,001$, $n = 5$) evidenciado pelo *insert* na Figura 1. O limite de detecção encontrado foi de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$, estimado considerando três vezes o desvio padrão das medidas do controle (resposta sem enterotoxina) dividido pela inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação foi de $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foi estimado considerando dez vezes o desvio padrão das medidas do branco pela inclinação da curva de calibração.

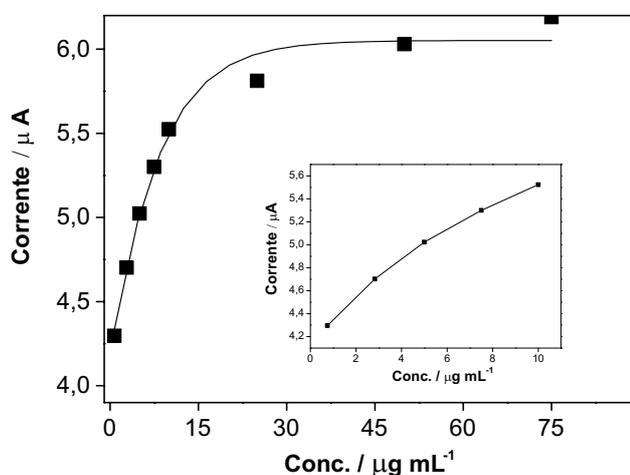


Figura 1. Curva analítica do biossensor para detecção de ESB em solução de PBS 50 mM e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 4 mM pH 7,4. *Insert:* Curva analítica evidenciando a linearidade da resposta do biossensor, considerando concentração de ESB até $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Um total de 100 amostras de queijo de coalho comercial foi adquirido e conduzido ao laboratório para análise de ESB pelo biossensor desenvolvido. Primeiramente, as amostras foram analisadas pelo kit comercial SET-RPLA test (Oxoid®) no intuito de identificar as amostras contaminadas (positivas) e não contaminadas (negativas) por ESB utilizando um método convencional de análise. A extração das enterotoxinas foi realizada em solução salina (0,85%), conforme protocolo do fabricante (Oxoid®); em seguida, elas foram purificadas com clorofórmio, filtradas em membrana ($0,22 \mu\text{m}$) de baixa ligação às proteínas e determinadas qualitativamente por aglutinação passiva de látex invertida.

Foram selecionadas dez amostras de queijo de coalho contaminadas e dez não contaminadas

com ESB para serem testadas pelo biossensor, cuja resposta foi baseada na amplitude da corrente elétrica do pico do voltamograma. O biossensor foi capaz de distinguir as amostras contaminadas e não contaminadas de queijo. Os resultados, apresentados na Figura 2, indicam que o biossensor é adequado na identificação de amostras contaminadas e não contaminadas com ESB e pode ser utilizado para detecção qualitativa e quantitativa de ESB em amostras de queijo.

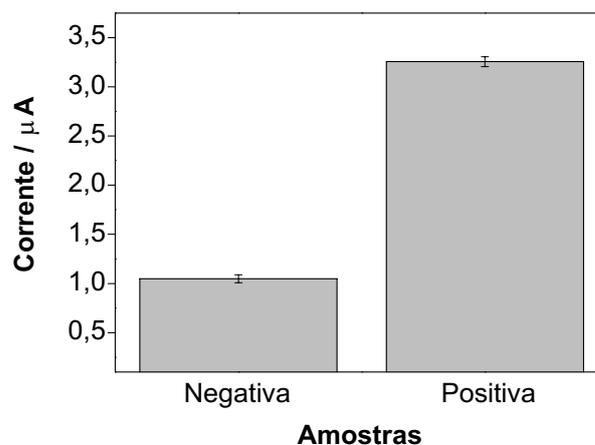


Figura 2. Avaliação da resposta do biossensor em amostras de queijo de coalho contaminadas e não contaminadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Funcap e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- ALONSO-LOMILLO, M. A.; DOMÍNGUEZ-RENEO, O.; MATOS, P. M.; ARCOS-MARTÍNEZ, J. Electrochemical determination of levetiracetam by screen-printed based biosensors. *Bioelectrochemistry*, v. 74, p. 306-309, 2009.
- BORGES, M. F.; SILVEIRA, D. B.; BASTOS, M. S. R.; MACHADO, T. F.; CHAGAS, B.S.; LIMA, C. P. Ocorrência de enterotoxinas estafilocócicas em queijo de coalho. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 29., 2012, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: EPAMIG: Instituto de Laticínios, 2012, v. 1, p.1-5.
- DOMINGUEZ-RENEO, O.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; ARCOS-MARTINEZ, M. J. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta*, v. 73, p. 202-219, 2007.
- HUANG, L.; PENG, Z.; GUO, Y.; PORTER, A. L. Identifying the emerging roles of nanoparticles in biosensors. *Journal of Business Chemistry*, v.142, p.459-469, 2007.

LARKIN, E. A.; CARMAN, R. J.; KRAKAUER, T.; STILES B. G. *Staphylococcus aureus*: The toxic presence of a pathogen extraordinaire. **Current Medical Chemistry**, v.16, p. 4003-4019, 2009.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic and Molecular Research**, v. 2, p.163-176, 2003.

OMOE, K.; MANISHIK, I.; HU, D.; KATO, H.; FUGANE, Y.; ABE, Y.; HAMAOKA, S.; WATANABE, Y.; NAKANE, A. UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. **Infection and Immunity**, v.73, p. 5540-5546, 2005.

PIMENTA-MARTINS, M. G. R.; FURTADO, R. F.; HENEINE, L. G. D.; DIAS, R. S.; BORGES, M. F.; ALVES, C. R. Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p.138-143, 2012.

PINGARRÓN, J. M.; YAÑEZ-SEDEÑO; GONZÁLEZ-CORTÉS. Gold nanoparticle – based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 5848-5866. 2008.

YANG, M.; SUN, S.; BRUCK, H. A.; KOSTOV, Y.; RASSOLY, A. Electrical percolation-based biosensor for real-time direct detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB). **Biosensors and Bioelectronics**, v.15, p.2573–2578, 2010.

Comunicado Técnico, 205



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (0xx85) 3391-7100

Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7141

E-mail: cnpat.sac@embrapa.br

1ª edição (2013): on-line

Comitê de Publicações

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*

Secretário-Executivo: *Marcos Antônio Nakayama*

Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda.*

Expediente

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*