



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

Aírís Maria Araújo Melo¹
Dalila Lima Alexandre²
Roselayne Ferro Furtado³
Maria de Fatima Borges⁴
Carlucio Roberto Alves⁵
Evânia Altina Teixeira de Figueiredo⁶

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 cm², 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⁻¹), que permitiu

¹ Bióloga, doutoranda do Curso de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio) na Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, airismelo@hotmail.com

² Química pela Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Dalila_liale@outlook.com

³ Bióloga, D.Sc. em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, roselayne.furtado@embrapa.br

⁴ Farmacêutica-bioquímica, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, maria.fatima@embrapa.br

⁵ Químico, D.Sc. em Química, professora da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, alvescr@yahoo.com

⁶ Bióloga, D.Sc. em Microbiologia, professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, evanialtina@gmail.com

a imobilização orientada do anticorpo primário anti-*Salmonella* (75 mg mL⁻¹). 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*: 10¹, 10³ e 10⁶ UFC mL⁻¹ (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⁻¹ 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⁻¹.

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 10⁶ e 10⁵ UFC mL⁻¹, 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⁻¹, 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. 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

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*