

IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO FUNCIONALIZADO COM PONTOS QUÂNTICOS PARA DETECÇÃO RÁPIDA E SENSÍVEL DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Denilson M. Feitoza¹; Rachel M. Castelo; Marília de A. Oliveira; Ruan S. Santana; Airis M. A. Melo; Roselayne F. Furtado; Terezinha F. Machado; Carlucio R. Alves

¹Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências, CCT, e-mail: denilson.menezes@aluno.uece.br

Palavras-Chave: Biossensor, Pontos quânticos, Cronoamperometria.

Introdução

Salmonella sp. é um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, podendo ser contaminados durante a produção e armazenamento. 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, podendo ou não ter uma 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 HASSENA 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.

Os imunossensores eletroquímicos possuem a capacidade de identificar microrganismos patogênicos devido a presença do anticorpo referente ao seu antígeno, característica que o torna altamente sensível, seletivo com alta precisão e reprodutibilidade durante a medição elétrica (SUBHAN; MUZIBUR RAHMAN, 2022). Os pontos quânticos de carbono (PQ) são um novo tipo de material nanoestruturado à base de carbono que apresenta fluorescência. São nanopartículas de carbono quase esféricas exclusivas ultrafinas e tamanho inferior a 10 nm (LIU et al., 2020) normalmente compostos por um núcleo carbogênico, com grupos funcionais ligados a locais da superfície, que aumentam a possibilidade de interação química com outras moléculas. Os PQs que foram sintetizados a partir da biomassa da amêndoa do pequi para este estudo proporcionou um aumento do sinal elétrico e identificação da molécula alvo cada vez mais rápido. Os pontos quânticos foram testados na conjugação do anticorpo em substituição a enzima peroxidase como alternativa no desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo e com capacidade maior de transferência eletrônica, conseguindo aumentar a sensibilidade de sinal em nano ampère (nA) e com limite de detecção (LOD) cada vez menor.

O objetivo desse estudo foi realizar a montagem do imunossensor com o anticorpo previamente conjugado com os pontos quânticos e avaliar o desempenho para identificação de

salmonella Typhimurium, sua seletividade em meio a bactérias gram positivas e gram negativas como também avaliar sua sensibilidade ao patógeno vivo e morto.

Material e Métodos

Purificação e marcação do anticorpo com pontos quânticos

O soro polivalente anti-*Salmonella* Poli A-I e Vi com foi saturado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45% sob agitação (15.303 x g) por 30 minutos a 4°C, seguido de repouso por 24 horas. O precipitado foi dialisado contra tampão PBS 10 mM, pH 7,4 por 24 horas e a concentração foi determinada em espectrofotômetro digital UV. A conjugação do anticorpo com os PQs (anti-PQ) foi feita através da mistura em tampão PBS usando uma relação de 1:6 (m/m), deixando sob agitação por 24h.

Cultura de bactérias

A cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 51812 foi cultivada em caldo BHI a 37 °C por 24 horas. A dispersão bacteriana foi centrifugada a 3,826 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pallet foi lavado com tampão PBS estéril 10 mM pH 7,4 e, com o mesmo tampão, foram preparadas suspensões bacterianas nas concentrações de 10 a 10⁷ UFC mL⁻¹ pelo método turbidimétrico de McFarland. As concentrações foram confirmadas por contagem em placas. Uma alíquota de 100 µL de cada concentração bacteriana foi retirada e adicionada em 2 mL da solução de PBS para a montagem do biossensor. Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 12600 e *Escherichia coli* ATCC 4157 foram também usadas para os ensaios de especificidade do biossensor com concentração de 10 UFC mL⁻¹ das bactérias, utilizando-se a mesma metodologia reportada para *Salmonella* Typhimurium. Os ensaios para sensibilidade de *Salmonella* inativa foram feitos utilizando a concentração 10 UFC/mL⁻¹ após aquecimento de 70°C durante 30 minutos.

Montagem do imunossensor

O eletrodo foi inicialmente mergulhado em uma solução etanólica de cisteamina a 10 mM durante 3 horas. Em seguida, foi lavado com etanol e deixado secar à temperatura ambiente. Posteriormente, a proteína foi adicionada a uma solução de EDC a 2 mM e NHS a 5 mM, com uma concentração de 7,5 mg/mL, permanecendo por 1 hora para ativar os grupos carboxílicos. Após essa ativação, o eletrodo foi imerso na solução de proteína A ativada por 1 hora. Em seguida, realizou-se a lavagem com tampão fosfato (PBS) a 10 mM e pH 7,4. O eletrodo modificado foi imerso overnight em uma solução de anticorpo primário a 2 mg/mL e lavado novamente com PBS. Este eletrodo foi então imerso em uma solução de BSA a 1% durante 1 hora para bloquear os sítios inespecíficos de ligação, seguido por uma nova lavagem com PBS. Terminado a montagem, o eletrodo foi mergulhado na solução do patógeno por 1h nas concentrações supracitadas e finalizado com a imersão em solução do anticorpo secundário (Anti-PQ) por 1h.

A caracterização elétrica foi realizada 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 fosse alcançada em 120 s. Todas as medições eletroquímicas foram executadas em temperatura ambiente e realizadas utilizando-se um potenciostato/galvanostato AUTOLAB e o seu software NOVA 1.2 para saída dos dados.

Resultados e Discussão

Observando a Figura 1 constatou que o imunossensor foi capaz de distinguir diferentes concentrações de *Salmonella* ($p < 0,05$). Isso permitiu a construção de uma curva analítica capaz de determinar o limite de detecção (LOD) do dispositivo. O LOD determinado a partir da curva analítica obtida através da equação da reta fornece o coeficiente linear e o desvio padrão do branco para determinar este valor baseado na relação 1:

$$LOD = Y_A + 3S_B \quad (1)$$

Onde Y_A é o coeficiente linear e S_B o desvio padrão do branco. O valor de LOD para este dispositivo foi de 0,005 UFC/mL. O resultado indica que o biossensor funcionalizado com Cdots tem potencial para atingir um limite de detecção (LOD) inferior aos de métodos tradicionais, como os que utilizam enzima peroxidase, de acordo com estudos anteriores (MELO et al., 2016, 2021). Esse avanço tecnológico aponta para o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e eficientes na detecção de patógenos alimentares, abrindo caminho para diagnósticos mais rápidos e precisos. Exemplos disso foi o desenvolvimento de um biossensor à base de *carbon dots* com 48,8 % de rendimento quântico para a detecção de *Salmonella typhimurium*, apresentando um limite de detecção de 0,079 μM (GARG; PRASAD, 2024).

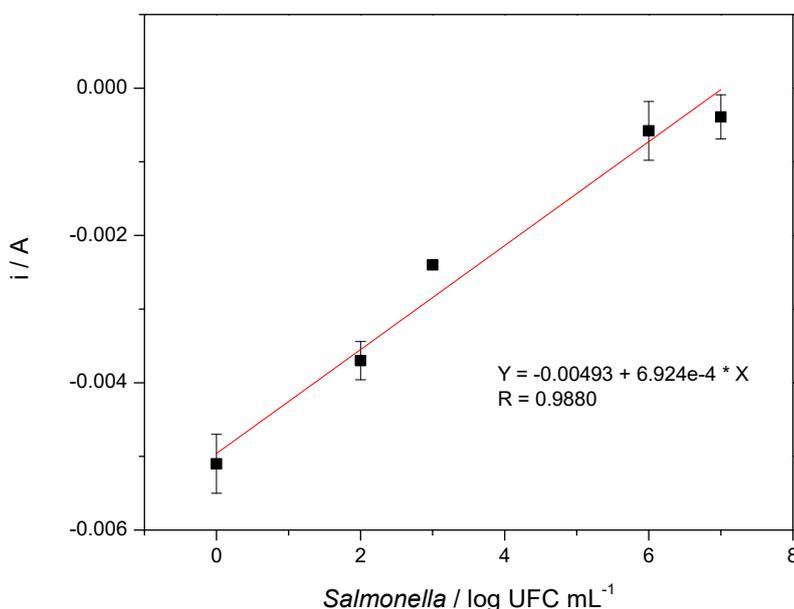


Figura 1. Curva de calibração para o patógeno em diferentes concentrações, variando de 10 a 10^7 UFC/mL⁻¹.

Com o objetivo de verificar a sensibilidade do imunossensor, o desempenho foi testado na presença do patógeno vivo e morto na concentração de 10 UFC mL⁻¹ em meio tamponado. Observa-se na Figura 2 que a variação do sinal elétrico diminuiu consideravelmente quando a *Salmonella* foi morta, pois o Δ é igual a zero. De outro modo, o sinal amperométrico do dispositivo aumentou na presença de *Salmonella* viva, atingindo um Δ igual a $-2,2$ mA. Sabe-se que a grande maioria dos sorotipos de *Salmonella* apresentam flagelos ao longo de sua estrutura física, o que favorece a interação com o anticorpo imobilizado no biossensor em meio estático. Após a pasteurização (morte), a bactéria com suas proteínas desnaturadas precipita no meio, e por isso as interações não acontecem.

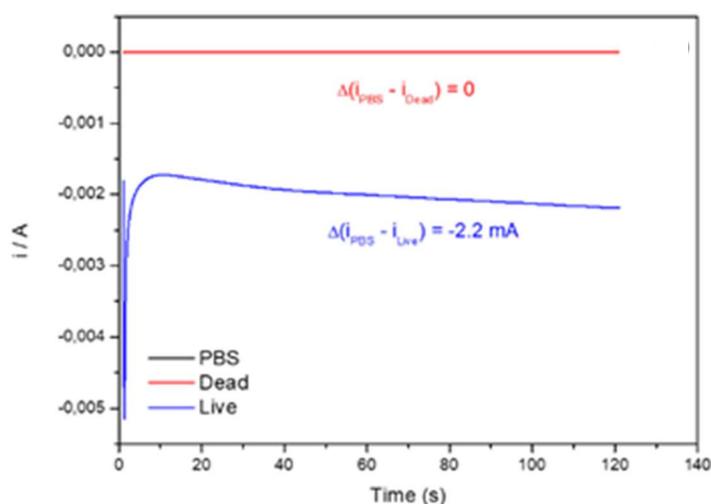


Figura 2. Comparativo do sinal elétrico dos biossensores com *S. Typhimurium* viva e morta. O delta da corrente elétrica (Δi) é caracterizado pela diferença de corrente elétrica da resposta do biossensor sem *Salmonella* em tampão fosfato 7,4 na concentração de 10 mM (—) e do biossensor com *Salmonella* viva (—) e morta (—) na concentração de 10 UFC mL⁻¹, na presença de hidroquinona 3 mM e peróxido de hidrogênio 300 mM.

As diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem ser um desafio para boa a especificidade do imunossensor. Gram-positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano, enquanto Gram-negativas apresentam uma parede celular mais complexa, incluindo uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos (HUANG et al., 2018; LI et al., 2021; SHEN et al., 2022). Essas diferenças influenciaram a interação entre o anticorpo imobilizado no biossensor, como mostrado na Figura 3. O biossensor conseguiu diferenciar a presença de *Salmonella* de maneira eficaz, minimizando reações cruzadas com *E. Coli* e *S. Aureus*. A mistura das três culturas diferentes nas concentrações de 10 UFC mL⁻¹ (MIX) a fim de avaliar o reconhecimento da *Salmonella* na presença de *E. Coli* e *S. Aureus* foi de $-4,83 \pm 0,02$ mA em relação ao sinal elétrico para o biossensor apenas com *Salmonella* ($-5,22 \pm 0,03$ mA). A diferença para as duas condições não foi significativa, podendo afirmar que não houve alteração no sinal para as duas condições.

Testes de especificidade para o biossensor à base de Ni-TCPP(Fe²⁺), uma porfirina de tetracarboxifenil de níquel e ferro (Fe²⁺) revelaram alta seletividade para *Salmonella*, sem reatividade cruzada significativa com outras bactérias testadas. Além disso, o biossensor mostrou boa reprodutibilidade e estabilidade, sendo eficaz em amostras biológicas clínicas, como urina humana diluída, com taxas de recuperação variando entre 98,7% e 102,7%. (Zheng et al., 2024).

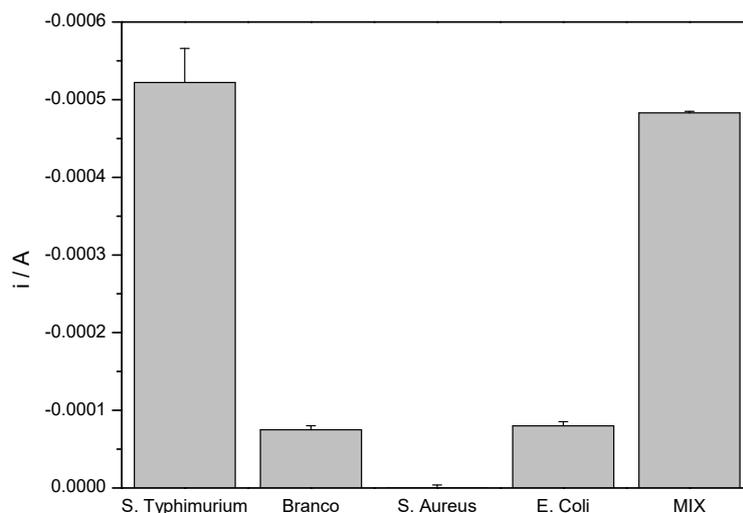


Figura 3. Análise de especificidade das amostras do imunossensor frente a bactérias gram positiva (*S. Aureus*) e gram negativas (*S. Typhimurium* e *E. Coli*). Apresentação das concentrações individuais e mistura, contendo cada uma na concentração de 10 UFC mL⁻¹.

Conclusões

O imunossensor apresentado neste trabalho teve um limite de detecção baixo para a *Salmonella*, eliminando a etapa de enriquecimento que alguns métodos convencionais precisam para obter um resultado positivo quando as bactérias estão presentes em baixas concentrações. O curto tempo de resposta do biossensor representa outra grande vantagem do imunossensor em comparação com outros testes de triagem no mercado que demandam uma média de 24 h para um diagnóstico. A capacidade do biossensor em diferenciar as formas inativas e ativas da *Salmonella* é uma grande vantagem desse dispositivo frente aos métodos utilizados no mercado. A seletividade do biossensor à *Salmonella* na presença de bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também foi aceitável.

Agradecimentos

FINEP, FUNCAP, CAPES e CNPq

Referências

BEN HASSENA, A. et al. 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, fev. 2015.

CHUESIANG, P. et al. Investigation of factors that impact the label-free surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the detection and discrimination of *Salmonella* Enteritidis. **LWT**, v. 150, 1 out. 2021.

FENG, K. et al. 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, 1 mar. 2022.

GARG, R.; PRASAD, D. Enhanced pyrophosphate detection: Utilizing oPD-derived carbon dots and Fe³⁺ interactions in a paper strip biosensor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 739, p. 150577, dez. 2024.



HU, J. et al. 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, nov. 2018.

HUANG, F. et al. An enzyme-free biosensor for sensitive detection of *Salmonella* using curcumin as signal reporter and click chemistry for signal amplification. **Theranostics**, v. 8, n. 22, p. 6263–6273, 2018.

JIA, K. et al. 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* Tphimurium in chicken meat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 380, p. 133399, abr. 2023.

LI, S.; ZHONG, T.; LONG, Q.; HUANG, C.; CHEN, L.; LU, D.; LI, X.; ZHANG, Z.; SHEN, G.; HOU, X. A gold nanoparticles-based molecularly imprinted electrochemical sensor for histamine specific-recognition and determination. 2021.

LIU, Y. et al. Advances in carbon dots: from the perspective of traditional quantum dots. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 4, n. 6, p. 1586–1613, 2020.

MELO, A. M. A. et al. **Electrochemical immunosensors for Salmonella detection in food. Applied Microbiology and Biotechnology**. [S.l.]: Springer Verlag. , 1 jun. 2016

_____. Performance of an amperometric immunosensor assembled on carboxymethylated cashew gum for *Salmonella* detection. **Microchemical Journal**, v. 167, 1 ago. 2021.

SHEN, Y. et al. A CRISPR-Cas12a-powered magnetic relaxation switching biosensor for the sensitive detection of *Salmonella*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 213, p. 114437, out. 2022.

SUBHAN, M. A.; MUZIBUR RAHMAN, M. Recent Development in Metallic Nanoparticles for Breast Cancer Therapy and Diagnosis. **The Chemical Record**, v. 22, n. 7, 10 jul. 2022.