



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

FRANCISCA AIRLANE ESTEVES DE BRITO

DESEMPENHO E ESTABILIDADE DE UM BIOSENSOR ELETROQUÍMICO
UTILIZANDO ELETRODOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* sp.
EM LEITE

FORTALEZA

2020

FRANCISCA AIRLANE ESTEVES DE BRITO

DESEMPENHO E ESTABILIDADE DE UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO
UTILIZANDO ELETRODOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* sp.
EM LEITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Microbiologia de Alimentos.

Orientador: Prof^ª. Dr. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.

Coorientador: Dr. Roselayne Ferro Furtado.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D32d de Brito, Francisca Airlane Esteves.
Desempenho e estabilidade de um biossensor eletroquímico utilizando eletrodos descartáveis para detecção de *Salmonella sp.* em leite / Francisca Airlane Esteves de Brito. – 2020.
73 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo .
Coorientação: Profa. Dra. Roselayne Ferro Furtado.
1. Imunossensor. 2. Método de detecção. 3. Validação. 4. Estocagem. I. Título.

CDD 664

FRANCISCA AIRLANE ESTEVES DE BRITO

DESEMPENHO E ESTABILIDADE DE UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO
UTILIZANDO ELETRODOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* sp.
EM LEITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Microbiologia de Alimentos.

Aprovada em: 13/03/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Roselayne Ferro Furtado (Coorientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Terezinha Feitosa Machado
Embrapa Agroindústria Tropical

A Deus, meu Senhor!

Aos meus pais, Airton e Cláudia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me conduziu a pessoas tão competentes e gentis, fundamentais para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Por sua maravilhosa e imerecida graça!

À profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, por sua orientação, carinho e exemplo de pessoa e profissional, sempre buscando aperfeiçoar seus conhecimentos e agir honesta e humanamente.

À pesquisadora Dra. Roselayne Ferro Furtado, por estar sempre disposta a ajudar, orientar e ser tão acessível, competente e gentil. Muito obrigada, Rose!

À pesquisadora Dra. Maria de Fátima Borges, por todo carinho e orientação. Agradeço cada conselho, incentivo e conversas que me impulsionaram a pensar mais alto.

À bolsista de iniciação científica Lorena Cristina Rodrigues Bezerra, minha fiel companheira de trabalho. Obrigada por sua amizade e disposição, sempre buscando fazer o melhor. Seu trabalho foi essencial, Lori.

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa, sempre disponíveis, amáveis e oferecendo todo suporte para realização das análises.

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFC, pela colaboração na realização das análises microbiológicas.

À querida equipe do laboratório de Tecnologia de Embalagens para Alimentos da Embrapa, Dra. Socorro Bastos, Dra. Selene Benevides, Nádyá, Luana, Rachel, Léo, Marilinha, Aíris, Roni, Gabi, Mary, Samara, Tiago, Joantina, Willi, Andressinha e Will por todo carinho, boas risadas e trabalho duro. Vocês fizeram todo trabalho ser ainda mais gratificante.

À minha família, meus pais Airton e Cláudia, por todo amor e confiança a mim concedidos. E às minhas irmãs, Airlene, Ariana, Adriele e Hadassa, amo muito vocês.

Aos meus amigos da Cru Campus, por me ajudarem a entender a Grande Comissão e o real sentido da palavra acolhimento. Mais que amigos, ganhei irmãos.

À Embrapa, CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“A busca pela excelência também é uma
maneira de louvar a Deus.”

Francis A. Schaeffer

RESUMO

As bactérias do gênero *Salmonella* são associadas á doenças transmitidas por alimentos. A forma de detecção usualmente empregada é laboriosa e apresenta elevado consumo de material. Biossensores para *Salmonella* são métodos alternativos que têm apresentado resultados promissores. No entanto, seu desempenho pouco tem sido avaliado em amostras reais e a estocagem destes dispositivos tem sido ignorada. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros de funcionamento e condições de estocagem de um biossensor eletroquímico utilizando eletrodos descartáveis (*screen printed*) para a detecção de *Salmonella* sp. em leite. Para isso, o dispositivo foi primeiramente avaliado em condições tamponantes na presença de *Salmonella* Typhimurium ATCC 51812. Posteriormente, amostras de leite cru e UHT integral contaminadas foram avaliadas por método de referência (BAM) para detecção de *Salmonella* e pelo biossensor. Os parâmetros de validação foram avaliados conforme recomendações da AOAC e foram: taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, sensibilidade, especificidade e probabilidade de detecção (POD). Os biossensores para a detecção da bactéria foram estocados por 15, 30, 60, 90 e 120 dias em condição refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C) em solução comercial estabilizante e solução estabilizante formulada. O biossensor apresentou elevada probabilidade de detecção, 1UFC. mL⁻¹ em solução tampão e 10 UFC. mL⁻¹ em leite cru e leite UHT. A comparação com o método tradicional permitiu a determinação dos parâmetros de desempenho do biossensor. Os resultados obtidos indicaram sensibilidade de 100%, especificidade de 100%, taxa de falsos positivos e taxa de falsos negativos de 0% para os níveis de inoculação controle negativo, 10¹ UFC.mL⁻¹ e 10³ UFC.mL⁻¹. Houve diferença significativa entre as duas soluções estabilizantes e temperaturas avaliadas. A melhor condição encontrada para o armazenamento do biossensor foi em solução estabilizante formulada e mantida sob refrigeração (4 °C). Os biossensores estocados nesta condição apresentaram 5 %, 11,87% e 69,81% de perda da amplitude de corrente elétrica aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente. Aos 120 dias os biossensores não responderam de forma qualitativa a presença da *Salmonella*.

Palavras-chave: Imunossensor. Método de detecção. Validação. Estocagem.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Salmonella* are pathogenic bacteria associated with foodborne diseases. The form of detection usually employed is laborious and presents high material consumption. Biosensors for *Salmonella* are alternative methods that have shown promising results. However, the performance of these biosensors has been rarely evaluated in real samples and the storage has been ignored. Thus, the aim of this study was to evaluate the operating parameters and storage conditions of an electrochemical biosensor using disposable electrodes (screen printed) for the detection of *Salmonella* sp. in milk. For this, at first, the device was evaluated in buffering conditions in the presence of *Salmonella* Typhimurium ATCC 51812. Subsequently, samples of contaminated raw milk and whole UHT milk were evaluated by reference method (BAM) to detect *Salmonella* and by the biosensor. The validation parameters were evaluated according to AOAC recommendations and were false positive rate, false negative rate, sensitivity, specificity and probability of detection (POD). The biosensors for the detection of the bacterium were stored for 15, 30, 60, 90 and 120 days in refrigerated condition (4 °C) and room temperature (25 °C) in commercial stabilizing solution and formulated stabilizing solution. The biosensor had a high probability of detection, 1 UFC. mL⁻¹ in buffer solution and 10 CFU. mL⁻¹ in raw milk and UHT milk. The comparison with the traditional method allowed the determination of the performance parameters of the biosensor. The results obtained indicated sensitivity of 100%, specificity of 100%, false positive rate and false negative rate were of 0% for the levels of negative control inoculation, 10¹ UFC.mL⁻¹ and 10³ UFC.mL⁻¹. The difference between the two stabilizing solutions and the temperatures evaluated was statistically significant. The best condition found for the storage of the biosensor was in a formulated stabilizing solution and kept under refrigeration (4 °C). The biosensors stored in this condition showed 5%, 11,87% and 69,81% of loss of amplitude of electric current in 30, 60 and 90 days, respectively. At 120 days, the biosensor stopped qualitatively detecting the pathogen.

Keywords: Immunosensor. Detection method. Validation. Storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Análise de leite cru e UHT pelo biossensor.....	37
Figura 2	– Curva de resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de <i>S. Typhimurium</i> (0 a 10^3 UFC mL ⁻¹). Resposta analítica em tampão PBS 10 mM (pH 7,4) com H ₂ O ₂ 300 mM e hidroquinona 3 mM a um potencial de 75 mV por 120s.....	41
Figura 3	– Probabilidade de detecção (POD) para diferentes concentrações de <i>S. Typhimurium</i> (0 a 10^3 UFC mL ⁻¹) em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,4.....	42
Figura 4	– Resposta amperométrica do biossensor na presença e ausência de <i>S. Typhimurium</i> (10^6 UFC mL ⁻¹) em leite integral UHT, leite cru e solução tampão (PBS). O desvio padrão está apresentado para n = 3.....	45
Figura 5	– Resposta amperométrica do biossensor na presença e ausência de <i>S. Typhimurium</i> (10^6 UFC.mL ⁻¹) em leite UHT e cru centrifugados e em solução tampão PBS 10mM pH 7,4.....	47
Figura 6	– Resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de <i>S. Typhimurium</i> em leite UHT. Resultados obtidos em tampão PBS 10mM (pH 7,4) na presença de H ₂ O ₂ (300 mM) e hidroquinona (3 mM), potencial 75 mV por 120 s.....	48
Figura 7	– Probabilidade de detecção (POD) para diferentes concentrações de <i>S. Typhimurium</i> (0, 10^0 , 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC mL ⁻¹) em leite UHT. Os valores estão representados para n=5.....	49
Figura 8	– Resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de <i>S. Typhimurium</i> em leite cru. Resultados obtidos em tampão PBS 10mM (pH 7,4) na presença de H ₂ O ₂ (300 mM) e hidroquinona (3 mM), potencial 75 mV por 120 s.....	49
Figura 9	– Probabilidade de detecção (POD) para diferentes concentrações de <i>S. Typhimurium</i> (0, 10^0 , 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC mL ⁻¹) em leite cru. Os valores estão representados para n=5.....	50

Figura 10 – Resposta amperométrica do biossensor em concentração conhecida de <i>S. Typhimurium</i> (10^6 UFC mL ⁻¹) em leite UHT após estocagem a seco e em solução, sob condição refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C)	55
Figura 11 – Intervalo de confiança das médias de resposta do biossensor na presença de <i>S. Typhimurium</i> (10^6 UFC mL ⁻¹) após estocagem em solução comercial estabilizante e solução formulada durante 120 dias em condição ambiente (25 °C) e refrigerada (4 °C).....	58
Figura 12 – Resposta amperométrica do biossensor em concentração conhecida de <i>S. Typhimurium</i> (10^6 UFC mL ⁻¹) em leite UHT integral após estocagem em solução comercial durante 120 dias. O desvio padrão está apresentado para n = 10.....	59
Figura 13 – Resposta amperométrica do biossensor em concentração conhecida de <i>S. Typhimurium</i> (10^6 UFC mL ⁻¹) em leite UHT integral após estocagem em solução formulada durante 120 dias. O desvio padrão está apresentado para n = 10.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Métodos rápidos comerciais para pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	23
Tabela 2	– Biossensores eletroquímicos para detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	27
Tabela 3	– Indicadores de desempenho da AOAC para métodos qualitativos e quantitativos.....	31
Tabela 4	– Cálculo dos indicadores de desempenho do biossensor.....	39
Tabela 5	– Desvio padrão relativo (DPR) calculado para as respostas amperométricas do biossensor para as concentrações de <i>S. Typhimurium</i> testadas em solução tampão 10mM pH 7,4.....	43
Tabela 6	– Análises microbiológicas das amostras leite cru e leite UHT.....	43
Tabela 7	– Média dos valores de gordura (g/100g) das amostras de leite UHT integral e cru antes e após centrifugação, segundo metodologia de Gerber.....	46
Tabela 8	– Comparação geral dos resultados obtidos pelo método de referência e pelo biossensor para análise de <i>Salmonella</i> sp. em leite cru e UHT.....	51
Tabela 9	– Resultados para sensibilidade e taxa de falso-negativos para o biossensor em comparação ao método de referência da FDA, para diferentes níveis de inoculação de <i>Salmonella</i> sp. em leite cru e UHT.....	52
Tabela 10	– Comparação da probabilidade de detecção (POD) obtidos pelo método de referência (POD_{ref}) e pelo biossensor (POD_{bio}) em diferentes níveis de inoculação para análise de <i>Salmonella</i> sp. em leite cru e UHT.....	54

Tabela 11 – ANOVA dos dados transformados para a resposta do biossensor na presença de <i>S. Typhimurium</i> (10^6 UFC mL ⁻¹) em leite UHT.....	57
Tabela 12 – Percentual de redução de corrente elétrica catódica dos dispositivos após estocagem em solução estabilizante formulada e comercial ao longo do tempo (15; 30; 60, 90 e 120 dias) em condição refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C).....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2.1	<i>Objetivos específicos</i>	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	<i>Salmonella</i>	17
3.1.1	<i>Sorologia e Patogênese</i>	18
3.1.2	<i>Doenças transmitidas por alimentos</i>	19
3.1.3	<i>Leite como veículo de transmissão de Salmonella</i>	20
3.1.4	<i>Métodos de detecção de Salmonella em alimentos</i>	21
3.1.4.1	<i>Método convencional de análise</i>	21
3.1.4.2	<i>Métodos rápidos de análise</i>	23
3.2	Biossensores	25
3.3	Protocolos de Validação de Métodos de Análise Microbiológica	27
3.3.1	<i>Food and Drug Administration (FDA)</i>	28
3.3.2	<i>ISO 16140</i>	28
3.3.3	<i>AOAC</i>	30
4	METODOLOGIA	33
4.1	Obtenção das amostras de leite	33
4.2	Crescimento e preparo da cepa de referência	34
4.3	Obtenção e marcação dos anticorpos	34
4.4	Montagem e resposta do biossensor	34
4.4.1	<i>Montagem do biossensor</i>	34
4.4.2	<i>Resposta analítica</i>	35
4.4.3	<i>Parâmetros de desempenho</i>	35
4.4.3.1	<i>Avaliação em condição tamponante</i>	35
4.4.3.2	<i>Avaliação em leite</i>	36
4.4.3.2.1	<i>Análise microbiológica</i>	36
4.4.3.2.2	<i>Preparo e análise das amostras</i>	37
4.4.4	<i>Parâmetros de validação em leite</i>	38
4.5	Estocagem do biossensor	39

4.6	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Parâmetros de desempenho em condição tamponante	40
5.1.1	<i>Probabilidade de Detecção (POD)</i>	42
5.1.2	<i>Precisão – repetibilidade</i>	43
5.2	Parâmetros de desempenho em leite	44
5.2.1	<i>Diagnóstico microbiológico das amostras</i>	44
5.2.2	<i>Pré-tratamento das amostras</i>	44
5.2.3	<i>Detecção de Salmonella</i>	47
5.2.3.1	<i>Amplitude de corrente e POD</i>	47
5.3	Parâmetros de validação em leite	50
5.3.1	<i>Avaliação dos parâmetros</i>	50
5.3.2	<i>Comparação com método de referência</i>	53
5.4	Aspectos de estocagem	55
5.4.1	<i>Condições de estocagem</i>	55
5.4.2	<i>Avaliação do desempenho ao longo do tempo</i>	57
5.4.2.1	<i>Avaliação do biossensor em solução estabilizante comercial</i>	59
5.4.2.2	<i>Avaliação do biossensor em solução estabilizante formulada</i>	60
5.4.2.3	<i>Perda de resposta amperométrica dos biossensores</i>	62
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A – CÁLCULO DA POD	70
	ANEXO A – CÁLCULO DA DPOD	71

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* sp. são frequentemente associadas a doenças transmitidas por alimentos (DTA) sendo considerada uma importante questão de saúde pública e uma das principais causas de surtos envolvendo diversas matrizes alimentares (HAMMACK et al., 2012, SILVA et al 2018). Sua patogenicidade, mesmo frente ao baixo limite de infecção apresentado por alguns sorovares é um dos maiores fatores que justificam exigência legal, inclusive por entidades internacionais, da ausência deste patógeno em alimentos (CDC, 2018; FDA, 2015; FENG, 2010)

A Salmonelose é considerada uma das mais importantes enfermidades veiculadas por alimentos, segundo a Organização Mundial da Saúde, seja pelo número de pessoas afetadas, complicações e sequelas da doença ou quantidade e volume de produtos alimentícios contaminados (BORGES; ANDRADE; MACHADO, 2010). Vários surtos da doença têm sido notificados e apresentam estatísticas alarmantes, no entanto esses dados não evidenciam a real gravidade da situação, devido principalmente à subnotificação, oriunda da negligência nos casos domésticos e à falta de diagnóstico para a identificação do agente etiológico, nos casos em que há hospitalização (EFSA, 2018; MELO, 2015).

Embora a doença venha sendo associada a diversas categorias de alimentos, leite e seus derivados têm sido apontados como principais veículos do patógeno (EFSA, 2018; HAMMACK et al., 2012). Práticas que vão desde o manejo na ordenha à higienização deficiente de equipamentos de beneficiamento, além de pasteurização ineficiente, conservação e transporte do produto final em condições inadequadas tornam o leite susceptível à contaminação pela bactéria (MELO, 2015).

A forma de detecção do patógeno usualmente empregada é laboriosa, apresenta elevado consumo de material e dura cerca de 5 dias, para resultados presuntivos. Métodos rápidos têm sido empregados visando a redução de tempo nos resultados, porém ainda não estão totalmente difundidos no controle de qualidade de alimentos em virtude de seu alto custo e necessidade de recurso humano qualificado (HAMMACK et al., 2012; LEE et al., 2015; ANDREWS; JACCOBS; HAMMACK, 2018). O emprego de métodos que apresentem resultados confiáveis, praticidade e rapidez é requerido, inclusive como forma de reduzir a espera por resultados de análises microbiológicas e custos relacionados à estrutura laboratorial.

Os biossensores são dispositivos bioeletrônicos capazes de detectar rapidamente analitos (espécies químicas e/ou biológicas) tanto quantitativa como qualitativamente

(FURTADO *et al.*, 2008). Biossensores para *Salmonella* são métodos alternativos que têm apresentado resultados promissores (BRANDÃO; LIÉBANA; PIVIDORI, 2015; LEE *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018) No entanto, no meio científico, é comum se referir ao desempenho do biossensor em condições consideradas otimizadas, seu funcionamento pouco tem sido avaliado em amostras reais. Além disso, a estocagem destes dispositivos, importante fator para avaliar a viabilidade comercial da tecnologia, tem sido ignorada (KUTTER; HARTMANN; SCHMID, 2006; LEE *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

Visando estabelecer critérios para a validação de métodos desenvolvidos e sua posterior comercialização, órgãos de normalização, organizações e autoridades reconhecidas na sua área de atuação, tais como FDA (Food and Drug Administration), ISO (International Organization for Standardization) e AOAC, elaboram e/ou normatizam diretrizes internacionais que contém aplicações sobre requisitos de acreditação. Busca-se padronizar e eliminar barreiras técnicas entre os países através da implementação de protocolos comparáveis e consistentes na área de métodos de controle de qualidade.

Entende-se por validação o processo que confere validade a um método analítico ou instrumento, cujo desempenho é aceito e os resultados são confiáveis. Assim, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Quando o objetivo é avaliar um método alternativo, a demonstração de que a confiança adequada é fornecida se dá quando os resultados obtidos pelo método alternativo são comparáveis àqueles obtidos usando o método de referência, através de critérios estatísticos contidos no protocolo de validação aprovado (AOAC, 2012; FDA, 2015; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002; INMETRO, 2018). Os programas da AOAC têm protocolos de validação para métodos qualitativos e quantitativos.

Neste trabalho, foram avaliados os parâmetros de validação do biossensor e a comparação entre o método alternativo e o método convencional. Além disso, a avaliação de desempenho do biossensor em amostras de leite após estocagem em diferentes condições de armazenamento foi realizada e pode contribuir com mais um passo para o uso comercial desta tecnologia.

2 OBJETIVO

2.1 Título da seção secundária

Avaliar os parâmetros de funcionamento, de validação e estocagem de um biossensor eletroquímico utilizando eletrodos descartáveis (*screen printed*) para a detecção de *Salmonella* sp. em leite.

2.1.1 *Objetivos específicos*

- a) Determinar os parâmetros de desempenho do biossensor em condição tamponante;
- b) Avaliar o desempenho do dispositivo em amostras de leite cru e leite UHT previamente contaminados;
- c) Comparar o desempenho do biossensor ao método convencional para detecção de *Salmonella* sp. segundo recomendações da AOAC;
- d) Determinar os indicadores de desempenho: sensibilidade, especificidade, taxa de falsos positivos e taxa de falsos negativos;
- e) Formular uma solução estabilizante e comparar a resposta do biossensor mantido nesta solução aos estocados em solução comercial em temperatura ambiente (25 °C) e refrigerada (4 °C) por 120 dias;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Salmonella*

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae* e a tribo *Salmonellae*, apresenta forma de bastonetes, Gram-negativos, não formadores de esporos. O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies que podem causar doenças em humanos: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella entérica*, que coloniza vários nichos em uma ampla gama de organismos hospedeiros, além de ser a maior preocupação de saúde pública, é composta por seis subespécies (HAMMACK et al., 2012; QUAN et al., 2018):

- *S. enterica* subsp. *enterica* (I)
- *S. enterica* subsp. *salamae* (II)
- *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa)
- *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb)
- *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV)
- *S. enterica* subsp. *indica* (VI)

O gênero pode ainda ser dividido em categorias, com base na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por ele determinado: *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febres tifoide e paratifoide); *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Abortusequi* (equinos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais; salmonelas zoonóticas, que incluem a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, responsáveis por quadro de gastroenterite (enterocolite) ou por doenças de transmissão alimentar (APHA, 2018; BRASIL, 2011; CDC, 2018; MELO, 2015)

Além da divisão em espécies e subespécies o gênero *Salmonella* é comumente subdividido em sorotipos baseado no esquema de Kaufmann-White, publicado pela primeira vez em 1934, que diferencia as estirpes de *Salmonella* por suas propriedades antigênicas superficiais e flagelares. Em cada subespécie são reconhecidos diferentes números de sorovares tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Entre as espécies, a subespécie *S. enterica* apresenta maior número de sorovares, sendo responsável por 99% dos isolamentos, usualmente de animais de sangue quente (BRASIL, 2011).

Quando Kaufmann propôs o esquema pela primeira vez, 44 sorotipos tinham sido descobertos. Em de 2007, o número de sorotipos era de 2.579, atualmente, existem mais de

2.600 sorovares de *Salmonella* (HAMMACK et al., 2012; QUAN et al., 2018).

No que tange a forma da redação da nomenclatura atual, os sorotipos não são mais considerados espécies e portanto, não devem ser escritos em itálico ou sublinhado (BRASIL, 2011; EUZÉBY, 1999).

3.1.1 Sorologia e Patogênese

O gênero *Salmonella* apresenta vários mecanismos que resultam em sua patogenicidade, dentre os quais podem ser citados poder invasivo, produção de citotoxinas, presença de plasmídeos que conferem virulência e antígenos de superfície (KUSHIDA, 2015).

Os mais de 2.600 sorovares identificados não podem ser diferenciados bioquimicamente e, portanto, a diferenciação se dá através de seus antígenos somáticos, flagelares e capsulares. Este procedimento está baseado em reações imunológicas. A distinção entre as diversas cepas de *Salmonella* deve-se a estrutura antigênica característica de cada sorotipo, sendo três os principais antígenos de interesse no diagnóstico: o antígeno O (somático), o antígeno H (flagelar) e o antígeno Vi (capsular) (ALIKHAN et al., 2018).

O antígeno de parede ou antígeno “O” é considerado termoestável (1hora/100°C), não sendo destruído pelo álcool etílico a 50° GL. Esse antígeno é composto de três partes: porção lipídica, responsável pela toxicidade e características pirogênicas; porção basal e polissacarídeo, característico da especificidade somática das formas lisas (S). É constituído de cadeias repetitivas, cujo arranjo espacial confere natureza definida. Esta, aliada ao tipo de ligação, determina a especificidade dos antígenos “O” (KUSHIDA, 2005).

O antígeno flagelar ou antígeno “H” (Hauch) está presente nas enterobactérias móveis e sua composição é proteica, designada flagelina. As diferenças antigênicas surgem devido a variações na estrutura primária (contendo aminoácidos) das diferentes moléculas de flagelina. A estrutura flagelar possui como característica importante a termolabilidade, podendo ser destruído a 100°C/1h, bem como após ação lenta do álcool 50° GL, sendo resistente à solução de formol a 0,5% (BRASIL, 2011; HAMMACK et al., 2012).

O antígeno de superfície ou envoltório “Vi” apresenta sua localização espacial externa, a qual dificulta a detecção do antígeno somático. Usualmente, encontra-se presente em cepas de *S. Typhi* isoladas de pacientes, podendo também ser detectados em *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*. São termolábeis, podendo ser destruídos pelo aquecimento da suspensão a 100°C/10 a 15 minutos (BRASIL, 2011). De acordo com o sorotipo e levando em consideração fatores de virulência, bactérias do gênero *Salmonella* podem causar as doenças:

febre tifoide e paratifoide, além da salmonelose, forma mais branda (HAMMACK et al., 2012).

A febre tifóide, causada pelos sorotipos *S. Typhi* e *S. Paratyphi* é mais grave e tem uma taxa de mortalidade maior que a salmonelose não tifóide. Sua sintomatologia é caracterizada por febre alta, diarreia ou constipação, dores de cabeça e letargia (sonolência ou lentidão) e, às vezes, erupções cutâneas. É uma condição muito séria; até 10% das pessoas que não recebem tratamento podem morrer (HAMMACK et al., 2012; SNOW, 2006).

A salmonelose, por sua vez, pode ser causada por todos os demais sorotipos que não *S. Typhi* e *S. Paratyphi*. Os sintomas da salmonelose não tifóide podem ser bastante desagradáveis, geralmente aparecem 12 a 72 horas após a infecção, e incluem febre, dor abdominal, diarreia, náusea e, às vezes, vômito. A doença geralmente dura de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento. No entanto, em crianças e idosos, e nos casos em que as bactérias entram na corrente sanguínea, a antibioticoterapia pode ser necessária. (HAMMACK et al., 2012; WHO, 2017).

3.1.2 Doenças transmitidas por alimentos

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são aquelas causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados. Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem mais de 250 tipos de DTA no mundo, sendo que a maioria delas são infecções causadas por bactérias e suas toxinas. Em muitos países, durante as últimas duas décadas, têm sido consideradas um crescente problema econômico e de saúde pública (WHO, 2018).

Food and Drug Administration (FDA) e Centers for Disease Control and Prevention (CDC) são autoridades internacionalmente reconhecidas no que diz respeito à segurança de alimentos. Nos EUA, o FDA avalia a potencial exposição e riscos e fornece informações sobre a prevenção de doenças transmitidas por alimentos. O CDC, especificamente, é responsável pelo monitoramento dos surtos e casos de enfermidades de origem alimentar nos Estados Unidos, e estima que a *Salmonella* cause cerca de 1,2 milhão de doenças, 23.000 hospitalizações e 450 mortes a cada ano. Os departamentos de saúde pública identificam e investigam surtos de doenças de origem alimentar causadas por agentes entéricos bacterianos, virais, parasitárias e químicos / tóxicos e apontam os alimentos como a origem de cerca de 1 milhão dessas enfermidades (CDC, 2018).

A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization - WHO) estima que doenças diarreicas transmitidas por água e por alimentos contaminados sejam responsáveis

por cerca de 2,2 milhões de óbitos anualmente, sendo 1,9 milhão de crianças (WHO, 2013).

Considerada uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, as bactérias do gênero *Salmonella* são geralmente transmitidas aos seres humanos através do consumo de alimentos contaminados de origem animal (CDC, 2018). Porém, vários alimentos já foram associados a surtos incluindo carnes, aves, ovos, leite e produtos lácteos, peixes, camarão, especiarias, fermento, coco, molhos, saladas, misturas para bolo, cremes, sobremesas e coberturas que contêm ovos crus, gelatina, manteiga de amendoim, cacau, chocolate, sorvete, frutas e legumes, como tomates, pimentões e melão (CDC, 2018; HAMMACK et al., 2012; SNOW, 2006).

O Regulamento n.º 1441/2007 da Comissão Europeia, de 5 de Dezembro de 2007, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis a alimentos, assim como determinado pelo FDA e pela Organização Internacional para Padronização (ISO), define que a presença de *Salmonella spp.* em 25 g de alimento pronto para consumo é suficiente para ser considerado um fator de risco para a saúde humana. Dessa forma, se este patógeno for detectado, o produto alimentício é classificado como insatisfatório (ANDREWS; JACCOBS; HAMMACK, 2018; UE, 2007).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), através da Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, que estabelece padrões microbiológicos para alimentos, também determina que o alimento próprio para o consumo humano deve apresentar ausência de *Salmonella sp.*, em 25 g ou mL (BRASIL, 2001).

3.1.3 Leite como veículo de transmissão de *Salmonella*

A salmonelose constitui um dos problemas mais importantes de saúde pública no mundo, por ser uma das causas mais frequentes de infecção gastrointestinal bacteriana veiculada por alimentos. Leite e seus derivados estão elencados entre a categoria de alimentos mais associadas a surtos da doença (HAMMACK et al., 2012; MUNGAI; BEHRAVESH; GOULD, 2015).

A contaminação do leite pelo patógeno pode ocorrer durante a ordenha, por bactérias frequentemente presentes nas fezes e na pele dos animais; através das superfícies contaminadas ou durante o processamento devido à presença de *Salmonella* nos equipamentos e á contaminações cruzadas. Práticas inadequadas, que vão desde o manejo na ordenha a higienização deficiente de equipamentos de beneficiamento, além de pasteurização

ineficiente, conservação e transporte do produto final em condições inadequadas tornam o leite susceptível à contaminação pela bactéria (MELO, 2015).

Cerca de 50% dos surtos de leite cru e laticínios relatados ao CDC de 2007 a 2016, nos EUA, envolveram crianças menores de 5 anos. Desses surtos, 19% das doenças eram causadas por *Salmonella*. Devido a subnotificação, *boa parte das estatísticas referentes a surtos envolvendo o patógeno* não representam a gravidade do problema, pois a maioria das doenças transmitidas por alimentos não faz parte de um surto reconhecido (CDC, 2018; MUNGAI; BEHRAVESH; GOULD, 2015).

3.1.4 Métodos de detecção de *Salmonella* em alimentos

Métodos de isolamento e detecção de *Salmonella* foram desenvolvidos para diferentes matrizes alimentares e são classificados basicamente em métodos convencionais e métodos rápidos (FDA, 2015). Métodos culturais convencionais de identificação podem exigir de 4 a 6 dias para obtenção de resultados presuntivos. Visando resultados confiáveis, porém em menor período de tempo, cerca de 1 a 2 dias, vários métodos rápidos estão disponíveis. Estes métodos rápidos podem ser baseados em ensaios imunológicos ou moleculares (DNA ou RNA), mas na maioria dos casos, ainda requerem um cultivo prévio para confirmar a presença de *Salmonella*, para fins regulatórios (HAMMACK et al., 2012). Em alimentos, devido ao reduzido número de microrganismos presentes, microbiota mista e numerosa, além de complexas composições de algumas matrizes alimentares, o isolamento e a identificação de *Salmonella* sp. pode ser um desafio.

3.1.4.1 Método convencional de análise

A metodologia convencional é considerada a mais confiável na detecção de *Salmonella*, internacionalmente recomendada por diferentes órgãos regulamentadores, como BAM/FDA – *Bacteriological Analytical Manual* da FDA, ISO, AOAC, *American Public Health Association* (APHA), *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) e segue basicamente quatro etapas, que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento, embora apresentem algumas variações na seleção de meios de cultura e na preparação das amostras.

De acordo com o *BAM/FDA*, para pesquisa de *Salmonella*, as etapas que compõem o método convencional têm duração de, no mínimo, cinco dias, para resultados presuntivos. A

etapa inicial consiste na preparação da amostra, cuja quantidade varia de acordo com o tipo de alimento a ser avaliado. No Brasil, a RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 exige ausência do patógeno em 25g ou 25 ml do alimento.

Na etapa seguinte de pré-enriquecimento, a alíquota da amostra é inoculada em 225 mL de caldo não seletivo, adequado ao tipo de alimento e às condições nutricionais, com incubação à temperatura de 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h. Esta etapa objetiva recuperar bactérias injuriadas e proporcionar o aumento da carga microbiana, aumentando a probabilidade de detecção da bactéria caso esteja presente na amostra.

O fornecimento de nutrientes e condições favoráveis de crescimento bacteriano promove o desenvolvimento de vários tipos de bactérias que podem interferir no crescimento da *Salmonella*. Dessa forma, com o objetivo de eliminar os microrganismos interferentes, na etapa de enriquecimento seletivo, meios de cultura líquidos compostos por substâncias que restringem o crescimento de competidores e favorecem a prevalência quantitativa de *Salmonella* são utilizados. Recomenda-se a utilização de dois diferentes meios de enriquecimento, pois a resistência de *Salmonella* aos agentes seletivos varia de acordo com a cepa. São utilizados geralmente, o caldo Rappaport-Vassilidis (RV) e o caldo tetratonato (TT).

Na etapa denominada plaqueamento seletivo e diferencial, os tubos com os caldos de enriquecimento seletivo são agitados em agitador “vortex” e a cultura de cada um dos tubos são então, estriadas em placas ágar entérico de Hectoen (HE), ágar bismuto sulfito (BS) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). A cultura é transferida através da técnica de estriamento em superfície para os meios seletivos e diferenciais. Esta etapa permite o crescimento da bactéria em colônias isoladas, com características morfológicas específicas, possibilitando sua diferenciação.

Para etapa de confirmação são selecionadas as colônias típicas e utilizados os meios ágar ferro açúcar triplo (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) para iniciar o processo presuntivo. Todas as culturas que apresentarem uma reação alcalina ao teste LIA e ao teste TSI devem ser submetidos aos testes bioquímicos e sorológicos para confirmação da espécie e sorotipo. Os testes bioquímicos podem ser realizados através de kits miniaturizados, que permitem a realização de um número maior de provas bioquímicas ao mesmo tempo. A confirmação sorológica verifica a presença de antígenos “O”, “Vi” e “H”, por testes de aglutinação com antissoros polivalentes. O BAM apresenta Tabelas de identificação com a relação de todos os testes bioquímicos e sorológicos para a conclusão da identificação (ANDREWS; JACCOBS; HAMMACK, 2018).

O método convencional é bastante sensível e confiável, no entanto, o tempo e o trabalho necessários para sua execução limitam a capacidade de análise dos laboratórios. Este método exige recurso humano qualificado, quantidade excessiva de materiais, muitas etapas para realização e obtenção de resultados tardios. Em função disso, há um grande interesse pelo desenvolvimento e validação de métodos rápidos, simples e com alto grau de confiabilidade, que possam ser aplicados de forma prática e eficaz no controle da qualidade de alimentos.

3.1.4.2 Métodos rápidos de análise

Com o objetivo de garantir segurança aos consumidores e qualidade microbiológica aos alimentos, técnicas mais convenientes, específicas e rápidas vêm sendo desenvolvidas. Métodos rápidos para detecção de *Salmonella* spp. podem ser definidos como aqueles que permitem a detecção do patógeno em amostras e fornecem resultados confiáveis dentro de algumas horas a um dia (LEE et al., 2015). Eles podem ser divididos em várias categorias, incluindo ensaios de cultura miniaturizados - adaptados de procedimentos convencionais que usam novos meios de cultura seletivos - ensaios baseados em imunologia, ensaios baseados em ácido nucléico e biossensores (SILVA et al., 2018).

Nos últimos anos, vários dispositivos para detecção rápida de *Salmonella* spp. foram desenvolvidos, testados e comercializados (BRANDÃO; LIÉBANA; PIVIDORI, 2015; LEE et al., 2015; MELO et al., 2016; VALDERRAMA et al., 2016). Embora haja uma gama de métodos disponíveis e muitos em desenvolvimento, a maioria é idealizada para detectar um alvo específico (Tabela 1).

Tabela 1 – Métodos rápidos comerciais para pesquisa de *Salmonella* spp. (Continua)

Princípio do Método	Nome Comercial	Fabricante
ELISA	Assurance GDS™ for Salmonella	BioControl
ELISA	SalmonellaTEK*	Organon Teknika
ELISA	Tecra® Salmonella	Tecra
ELISA	MicroELISA	Dynatech Lab.
ELISA	Immuno-magnetic-separation	Golden
ELISA	Salmonella ELISA Test SELECTA/OPTIMA	Bioline
Aglutinação	TUBEX IDL	Biotech
Aglutinação	Salmonella Screen	VICAM
Aglutinação	Bactigen	Wampole Labs
Aglutinação	Spactate	Rhone Poulenc

Aglutinação	Microscreen	Mercia
PCR	ABI Prism 7500	Applied Biosystems
PCR	BAX Salmonella PCR	DuPont
PCR	BAX Salmonella PCR	Qualicon
PCR	Gene-Trak	Neogen
Imunodifusão	Salmonella 1-2 Test	BioControl

Fonte: (LEE et al., 2015)

Métodos baseados em ensaios imunológicos e em ácido nucléico, ELISA e PCR, apresentam especificidade - probabilidade de o teste detectar um verdadeiro negativo - e sensibilidade - probabilidade de o teste detectar um verdadeiro positivo - comparáveis aos métodos convencionais. Quanto ao limite de detecção, ensaios de ELISA são capazes de detectar concentrações de *Salmonella* no nível de $10^4 - 10^5$ UFC.mL⁻¹, enquanto ensaios baseados em PCR têm nível de sensibilidade de 10^4 UFC.mL⁻¹ (LEE et al., 2015).

Apesar de requerer menor tempo para respostas e com grau de sensibilidade similar as obtidas por método convencional, os procedimentos alternativos também possuem algumas limitações. Quase todos os ensaios utilizados para detecção de patógenos específicos em alimentos, requerem etapa de pré-enriquecimento antes da análise. Quando ocorre a detecção de resultado positivo por método rápido, dito como presuntivo, deve-se obrigatoriamente realizar a confirmação por método padrão oficial. No entanto, embora a análise de confirmação possa se estender por vários dias, isso não é considerado como uma limitação, visto que os negativos são mais frequentemente encontrados na análise de alimentos (FENG, 2010).

Outro ponto a ser considerado na aplicação destes métodos se deve a interação de fatores como a matriz da amostra, presença de células não cultiváveis e substâncias inibitórias (gorduras, proteínas, polissacarídeos, metais pesados, antibióticos e compostos orgânicos) que podem afetar seu desempenho por alteração da sensibilidade e especificidade. Entretanto, visando prover formas de amenizar ou mesmo evitar estas interações, técnicas adicionais de preparação e purificação de amostras, como modificação de pré-enriquecimento e enriquecimento, diluição, centrifugação, filtração, injeção de fluxo, cromatografia, extrato de solvente orgânico e fluorescência vem sendo utilizadas, aprimorando os limites de sensibilidade e detecção dos métodos (KUTTER; HARTMANN; SCHMID, 2006; LEE et al., 2015; MELO et al., 2018; POLACZYK et al., 2008).

Segundo Silva et al.(2018), os métodos baseados em ensaios imunológicos, como o ELISA, são bastante promissores para a detecção rápida, porque combinam a especificidade dos anticorpos com a sensibilidade dos ensaios enzimáticos, conjugando enzimas facilmente

testadas a anticorpos ou antígenos. Eles podem ser classificados em três diferentes formatos: ensaio direto, indireto e sanduíche ou de captura. Vale enfatizar que quase todos os métodos rápidos comerciais de ELISA utilizam formato sanduíche, em que uma enzima peroxidase (HRP) é utilizada como marcador enzimático de um anticorpo secundário. Infelizmente, a maioria dos métodos comerciais baseados em ELISA necessita da etapa de enriquecimento, aumentando conseqüentemente o tempo total de análise. Neste contexto, ainda é necessário desenvolver e validar novos métodos e tecnologias simples para detecção *Salmonella* spp., com a capacidade de fornecer resultados válidos.

Atualmente, existem vários métodos propositalmente projetados para acelerar a detecção de patógenos, mas a maioria deles tem dificuldades para se validar e entrar no mercado, por apresentarem alta probabilidade de resultados falsos negativos, serem restritos a um tipo específico de matriz alimentar ou considerados caros pelas indústrias de alimentos (VALDERRAMA et al., 2016).

3.2 Biossensores

Dentre os vários métodos revisados recentemente (LEE et al., 2015; SU et al., 2011; VALDERRAMA et al., 2016; MELO, 2018) os biossensores são considerados uma ferramenta analítica promissora na detecção de *Salmonella* spp. (SILVA et al., 2018).

Estes dispositivos bioeletrônicos, capazes de detectar rapidamente analitos (espécies químicas e/ou biológicas) tanto quantitativa como qualitativamente, são constituídos basicamente por dois componentes principais: um transdutor que converte o evento de reconhecimento bioquímico em sinal elétrico mensurável e um processador para saída dos resultados. A interação da molécula biológica com o analito resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas que são detectadas e medidas pelo transdutor. O principal objetivo é produzir um sinal eletrônico proporcional em magnitude e/ou frequência, à concentração de um determinado analito ou grupo de analitos que interagem com o elemento biorreceptor (FURTADO et al., 2008).

O biorreceptor pode ser um tecido, microrganismo, organela, célula, enzima, ácido nucléico ou anticorpo. Os biossensores que utilizam anticorpos como biorreceptores são denominados imunossensores, apresentam o mesmo conceito dos imunossaios e a alta especificidade do complexo anticorpo-antígeno, porém com a vantagem de serem passíveis de automação e portatibilidade, necessitarem de volumes reduzidos de amostra e possuírem elevado potencial de miniaturização (FURTADO et al., 2008)

Quanto aos métodos de transdução, esses dispositivos podem ser classificados em eletroquímicos, ópticos, termométricos, piezoelétricos, magnéticos e micromecânicos ou combinações destes (VELUSAMY *et al.*, 2010).

Os transdutores eletroquímicos se destacam por apresentarem vantagens diferenciadas, baixo custo do equipamento, capacidade de miniaturização e sustentabilidade devido ao uso de poucos solventes e baixos volumes de amostra, tanto no desenvolvimento como na aplicação. Considerando que a aceitação pela indústria de novos métodos rápidos depende não apenas da velocidade, mas também do investimento inicial, custo, suporte técnico e facilidade de uso, os biossensores eletroquímicos são especialmente adequados para atender a esses requisitos (SILVA, 2015).

Os biossensores eletroquímicos, de acordo com a técnica de transdução específica utilizada são classificados em: amperométricos, potenciométricos, condutimétricos e biossensores impedimétricos (SU *et al.*, 2011). Apesar da diversidade, o transdutor amperométrico é mais comum em biossensores eletroquímicos. São de fácil manipulação e trabalham com potencial específico, reduzindo as chances de interferência de espécies químicas, sendo a concentração do analito diretamente proporcional à alteração na corrente elétrica. No entanto, na medida amperométrica, quando os biorreceptores são DNA ou anticorpos, a interação com o analito não gera íons redox, sendo necessária a conjugação a uma enzima catalítica como a peroxidase (FURTADO *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2011; VELUSAMY *et al.*, 2010).

Biossensores comerciais atualmente disponíveis no mercado requerem equipamentos, etapas de pré-enriquecimento ou pessoal treinado para realizar a análise e tratar os dados de saída. Como forma de solucionar esta problemática, observamos que muitos dispositivos para detecção rápida de patógenos veiculados por alimentos foram desenvolvidos recentemente (LAW *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2016; VALDERRAMA *et al.*, 2016). Apesar dos grandes avanços tecnológicos, a maior parte dos biossensores desenvolvidos demonstram desempenho comprovado apenas em condições tamponantes. Dispositivos que, no entanto, apresentam bom desempenho inclusive em amostras reais, não prosseguem em estudos de validação, impossibilitando o avanço da tecnologia e sua futura comercialização, mesmo mediante o bom desempenho em solução tampão (Tabela 2).

Desse modo, melhorias adicionais em termos de parâmetros de validação, tempo de análise, portabilidade e autonomia são necessárias. Além disso, biossensores eletroquímicos parecem ser a tecnologia mais aceitável e confiável para atingir os requisitos

de regulamentação e superar as barreiras de implementação industrial, dada a possibilidade de obtenção de um dispositivo lab-on-chip (LOC) ou laboratório em um chip, com as propriedades analíticas desejadas e adaptadas às necessidades industriais específicas a um custo potencialmente baixo (SILVA et al., 2018).

Tabela 2 – Biossensores eletroquímicos para detecção de *Salmonella* spp.

Referência	Limite de Detecção	Tempo de Detecção
FREITAS et al. (2014)	13 cells mL ⁻¹	1h
SILVA et al. (2015)	20 UFC.mL ⁻¹	75 min
XIANG et al. (2015)	25 UFC.mL ⁻¹	4h
FEI et al. (2016)	89 UFC.mL ⁻¹	80 min
WANG et al. (2016)	7.6 x10 ² UFC.mL ⁻¹	3h
XU et al. (2016)	10 ² UFC.mL ⁻¹	2h
SHEIKHZADEH et al. (2016)	3 UFC.mL ⁻¹	3h
ALEXANDRE et al. (2018)	10 UFC.mL ⁻¹	125 min
ZHANG et al. (2018)	3x10 ² UFC.mL ⁻¹	1,5h
WILSON et al. (2019)	10 UFC.mL ⁻¹	25 min

Fonte: (LEE et al., 2015; SILVA et al., 2018)

3.3 Protocolos de Validação de Métodos de Análise Microbiológica

Validação é a etapa posterior à fase de desenvolvimento, indispensável para assegurar o desempenho funcional e reprodutível de um produto ou processo visando uma escala comercial (FDA, 2015; INMETRO, 2018). A validação de um método alternativo para a microbiologia é o processo pelo qual um ou mais laboratórios confirmam, por exame, e fornecem evidências objetivas de que os requisitos para usos específicos são atendidos. Métodos alternativos desenvolvidos como opções a métodos convencionais devem passar impreterivelmente por esta etapa. A validação serve para demonstrar que o método pode detectar e identificar um analito ou analitos em uma ou mais matrizes a serem analisadas; usando um ou mais instrumentos ou plataformas e possui uma sensibilidade, especificidade, exatidão, veracidade, reprodutibilidade, e precisão demonstradas para assegurar que os resultados sejam significativos e apropriados para a tomada de uma decisão (AOAC 2012; FDA, 2019; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002).

A especificidade e seletividade referem-se à capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Ela é considerada em três níveis: a) repetibilidade (precisão intra-corrída) -

concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação; b) precisão intermediária (precisão inter-corridas) - concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes; c) reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) - concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos. A compreensão destes termos ajuda a entender e valorizar as análises exigidas para a validação de métodos (INMETRO, 2018).

No Brasil, não existe uma normativa a ser seguida para a validação de novos métodos alternativos de análise microbiológica, sendo recomendada a observação de normativas de caráter internacional estabelecidas por órgãos regulamentadores reconhecidos mundialmente. As principais normas de validação para métodos alternativos de análise microbiológica para a área de alimentos são estabelecidas pela AOAC, FDA e ISO.

3.3.1 Food and Drug Administration (FDA)

Na validação de métodos microbiológicos alternativos para alimentos, três níveis são definidos e servem para demonstrar que o método pode detectar, identificar e, quando aplicável, quantificar um analito ou analitos para um padrão definido de desempenho. O escalonamento de critérios dentro do processo de validação também fornece características da utilidade do método e direciona para o uso pretendido.

Os indicadores de desempenho utilizados para os métodos de identificação microbiológicos são: acurácia (proporção de amostras positivas verdadeiras recuperadas do novo teste em comparação com o teste de referência, quando inoculadas de forma semelhante), taxa de falso positivo, taxa de falso negativo, inclusividade, especificidade, limite de detecção, reprodutibilidade, repetibilidade e robustez (determina se pequenas alterações no procedimento ou fatores ambientais influenciam o desempenho do teste) (FDA, 2015).

3.3.2 ISO 16140

A ISO (*International Organization for Standardization*) 16140:2016 especifica o princípio geral e o protocolo técnico para a validação de métodos microbiológicos de produção dos alimentos. O documento é revisado a cada cinco anos. A ISO 16140 encontra-se dividida nas seguintes partes: a) Parte 1: Vocabulário - (ISO 16140-1, 2016); b) Parte 2:

Protocolo para a validação de métodos alternativos com um método de referência (certificação) (ISO 16140-2, 2016); c) Parte 3: Protocolo para a verificação de métodos alternativos de referência e validados implementados em um único laboratório (acreditação) (ISO 16140-3, 2016); d) Parte 4: Protocolo para validação de método em laboratório único (interno)(acreditação) (ISO 16140-4, 2016); e) Parte 5: Protocolo para validação interlaboratorial fatorial de métodos não alternativos (acreditação) (ISO 16140-5, 2016); e f) Parte 6: Protocolo para a validação de métodos alternativos (proprietários) para confirmação microbiológica e procedimentos de tipagem (certificação) (ISO 16140-6, 2016).

Destina-se a produtos direcionados ao consumo humano, à alimentação animal, amostras ambientais na área de produção de alimentos e rações, manuseio e amostras do estágio primário de produção. ISO 16140 é particularmente aplicável à determinação de bactérias e fungos. Algumas cláusulas da ISO 16140 poderiam ser aplicáveis a outros microrganismos ou seus metabólitos, a depender de caso a caso. No futuro, a orientação para outros organismos (por exemplo, vírus e parasitas) está prevista para ser incluída nesta parte ou em uma parte separada da ISO 16140. O protocolo de validação consiste em duas fases: a) estudo comparativo do método alternativo com um método de referência conduzido no laboratório responsável e b) um estudo interlaboratorial que também pode ser conduzido paralelamente (ISO, 2003).

Para métodos quantitativos, na fase de estudo comparativo, são utilizados quatro indicadores: exatidão, limite de detecção / quantificação, e inclusão/ exclusividade. Na fase de estudo interlaboratorial é abordada a precisão interlaboratorial do método alternativo contra o método de referência, estimando os indicadores de repetibilidade (variabilidade aleatória mínima), reprodutibilidade, (variabilidade aleatória máxima) e erro sistemático. Esta fase deve envolver pelo menos oito laboratórios e as amostras são preparadas a partir de uma matriz, contaminadas em quatro níveis, incluindo um controle negativo. A análise deve ser conduzida em duplicata pelo método alternativo e o de referencia (LOMBARD; LECLERCQ, 2011).

Para os métodos qualitativos são três os indicadores: exatidão, limite de detecção e inclusividade / exclusividade, de modo a caracterizar o desempenho do método alternativo em relação ao método de referência. Na segunda fase, o estudo interlaboratorial requer pelo menos dez laboratórios colaborativos. As amostras são preparadas com uma matriz contaminada em três níveis (incluindo um controle negativo) (LOMBARD E LECLERCQ, 2011). Os resultados são comparados aos obtidos quanto aos indicadores na primeira fase de estudo colaborativo.

3.3.3 AOAC

Estabelece normativas para os novos métodos químicos e microbiológicos serem avaliados quanto à confiabilidade. A AOAC possui dois programas pelos quais os métodos são avaliados e aprovados: AOAC OMA (*Official Methods of Analysis*SM) e PTM (*Performance Tested Methods*). O programa OMA é internacionalmente conhecido por seu rigoroso exame científico e sistemático dos Métodos Oficiais de Análise resultantes. O programa PTM evoluiu para um programa de certificação de métodos alternativos. Este programa oferece certificação como um ponto final para avaliação de métodos ou como entrada para validação de métodos para programas que exigem maior confiança e informações de reprodutibilidade.

Os métodos alternativos podem ser qualitativos (presença / ausência) ou quantitativos, e os protocolos são divididos em estudos pré-colaborativo e colaborativo. Para validação, os métodos alternativos microbiológicos submetidos para AOAC devem ser comparados a um método de cultura de referência (AOAC, 2012).

Estudo pré-colaborativo precede o Interlaboratorial, denominado também de estudo colaborativo interlaboratorial ou simplesmente colaborativo. O objetivo de um estudo pré-colaborativo é demonstrar a aplicabilidade do método a uma ou várias categorias de alimentos. O objetivo do Estudo Colaborativo é fornecer uma estimativa realista dos atributos de um método, particularmente desvios sistemáticos e aleatórios, esperado quando o método é usado na prática real. Nestes estudos, os alimentos são comumente inoculados com o organismo de interesse quando os produtos naturalmente contaminados são pouco frequentes. Geralmente, um isolado, cepa, sorotipo ou espécie diferente é usado para cada tipo de alimento. A inoculação do produto deve ser conduzida com uma cultura pura de uma estirpe. Culturas mistas não são recomendadas (FELDSINE et al., 2002).

Para os métodos qualitativos realizados sobre o aspecto pré-colaborativo, cada tipo de alimento é dividido em dois níveis. Um serve como controle negativo e outro seria um nível fracionário de inoculação. As amostras de teste controle e inoculadas devem ser preparadas ao mesmo tempo. Dependendo do laboratório em satisfazer este critério de validação, pode ser aconselhável preparar um terceiro nível que tenha um alto nível de inóculo, mas é opcional. (FELDSINE et al., 2002).

Para os métodos quantitativos, sejam eles pré-colaborativo ou colaborativo, os alimentos são artificialmente contaminados e divididos em três níveis inoculados (alto, médio

e baixo). Amostras de controle não inoculadas também são incluídas para cada tipo de alimento inoculado (FELDSINE et al., 2002).

No Estudo Colaborativo para métodos qualitativos é necessário um mínimo de 10 conjuntos de dados laboratoriais válidos por tipo de alimento. O planejamento deve incluir pelo menos 12-15 laboratórios por alimento porque alguns laboratórios são geralmente eliminados por várias razões. No método quantitativo são necessários pelo menos oito laboratórios. Em casos especiais envolvendo equipamentos muito caros ou laboratórios especializados, o estudo pode ser realizado com um mínimo de cinco laboratórios. O número de diferentes categorias de alimentos para os testes pré-colaborativos e colaborativos depende da aplicabilidade do método.

Os estudos qualitativos de validação de métodos podem ser divididos em dois tipos: design pareado e não design não pareado. Um estudo de design pareado é aquele em que a amostra é enriquecida e analisada pelo método alternativo (o novo método que está sendo validado) e pelo método de referência (o método oficial ou regulatório estabelecido). Esse projeto resulta de um enriquecimento comum ou pré-enriquecimento dos dois métodos. Quando as condições de enriquecimento diferem entre os dois métodos, o estudo de design é dito não pareado.

Os programas da AOAC têm os seguintes indicadores de desempenho para métodos qualitativos: taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, sensibilidade, especificidade, probabilidade de detecção, exclusividade e inclusividade. Para os quantitativos os indicadores são: repetibilidade, reprodutibilidade, desvio padrão relativo, limite de quantificação, robustez, exclusividade e inclusividade (Tabela 3).

Tabela 3 – Indicadores de desempenho da AOAC para métodos qualitativos e quantitativos. (Continua)

Métodos qualitativos	
Indicador	Definição
Taxa de falsos positivos	Probabilidade de uma amostra negativa pelo método de referência ser detectada como positiva pelo método teste, isto é, (número de amostras positivas pelo método teste e negativas pelo método de referência/no total de amostras negativas pelo método de referência).
Taxa de falsos negativos	É a probabilidade de uma amostra positiva pelo método de referência ser detectada como negativa pelo método teste, isto é, (número de amostras negativas pelo método teste e positivas pelo método de referência/no total de amostras positivas pelo método de referência).

Sensibilidade	Número total de porções do teste positivas confirmadas pelo método dividido pelo número total de porções de teste positivas confirmadas pelos métodos alternativos e de referência.
Especificidade	Número total de porções de teste negativo analisadas pelo método dividido pelo número total de porções de teste negativas confirmadas pelos métodos alternativos e de referência.
Probabilidade de Detecção (POD)	Probabilidade de detecção do analito alvo. É expressa pela proporção de resultados positivos sobre o número total de ensaios, levando em consideração a matriz e o nível ou concentração de analito.
Exclusividade	Exclusividade é expressa quando, mesmo na presença de cepas não-alvo que são potencialmente reativas de forma cruzada, não há interferência nos resultados obtidos pelo método alternativo.
Inclusividade	Inclusividade é a capacidade do método alternativo para detectar especificamente o analito alvo mesmo na presença de uma ampla variedade de cepas.
Métodos quantitativos	
Repetibilidade	A repetibilidade está dentro da precisão do laboratório, designada como a concordância entre resultados sucessivos e independentes obtidos pelo mesmo método em material de teste idêntico, sob as mesmas condições (por exemplo, aparelho, operador, laboratório e tempo de incubação).
Reprodutibilidade	A reprodutibilidade está entre a precisão dos laboratórios ou a concordância entre os resultados dos testes individuais em material de teste idêntico usando o mesmo método e obtido por operadores em diferentes laboratórios usando diferentes equipamentos.
Desvio padrão relativo	O desvio padrão relativo é uma medida útil de precisão em estudos quantitativos. O desvio padrão relativo é calculado dividindo a repetibilidade ou reprodutibilidade pela média. Os valores do desvio padrão relativo são independentes da quantidade de analito em um intervalo razoável e facilitam a comparação de variabilidades em diferentes concentrações.
Limite de quantificação	Menor concentração de analito em uma determinada amostra.
Robustez	Capacidade de um método permanecer inalterado por variações pequenas, porém deliberadas, dos parâmetros do método e que fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal.

Fonte: (AOAC, 2012; FDA, 2015; FELDSINE, 2002)

Os órgãos regulamentadores possuem protocolos harmonizados, ou seja, seguem aspectos técnicos da validação que são alinhados entre si, mas que permitem que as várias organizações mantenham seus critérios de aceitação e processos independentes. Isso viabiliza

a coleta de dados em um único conjunto de partes do teste, seguidas de análises estatísticas de acordo com cada diretriz de validação (AOAC, 2012; BRUNELLE, 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das amostras de leite

Para estudos iniciais do processo de validação do método alternativo, foram coletadas amostras de leite Ultra High Temperature (UHT) e leite cru. O leite UHT foi adquirido aleatoriamente, em estabelecimentos varejistas na cidade de Fortaleza (supermercados e mercearias). O leite cru utilizado foi adquirido em vacaria situada no mesmo município. As amostras de leite cru foram acondicionadas em vidros estéreis com capacidade de 1 litro. Após coleta, foram imediatamente transportadas em caixas isotérmicas sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará e para o Laboratório de Tecnologia de Embalagens de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical.

4.2 Crescimento e preparo da cepa de referência

A cepa de referência utilizada no estudo foi *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC[®] 51812[™], adquirida da certificadora de microrganismos Microbiologics[®] (Saint Cloud, MN, USA). A cepa liofilizada foi inoculada em caldo de infusão cérebro-coração (Becton, Dickinson and Company, Sparks-USA) por $24\text{h} \pm 2$ a 35°C e para a obtenção de colônias isoladas foi repicada em ágar infusão cérebro coração a 35°C por $24\text{h} \pm 2$. A cultura estoque foi mantida em ágar infusão cérebro coração inclinado, armazenada sob refrigeração (4°C) e em caldo infusão cérebro coração adicionado de 25% de glicerol (80% v/v), conservado a -80°C .

As culturas utilizadas para calibração do biossensor e para contaminação das amostras foram preparadas de acordo com Melo (2015), a partir do crescimento de cinco colônias da cepa de referência em 10 mL de caldo nutriente (Becton, Dickinson and Company, Sparks - USA) a 35°C por $24\text{h} \pm 2$. Na sequência, foi realizada centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. O meio de cultura contido no tubo foi substituído por 10 mL de tampão fosfato (pH 7,4). Para confirmação do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹) foi realizada contagem padrão em placas pela

técnica de plaqueamento em superfície, utilizando meio de cultura ágar nutriente (Becton, Dickinson and Company, Sparks - USA) a 35°C por 24h ± 2.

4.3 Obtenção e marcação dos anticorpos

Soros polivalentes anti-*Salmonella* O Poli A-I e Vi (Difco™) foram utilizados e os anticorpos foram precipitados com (NH₄)₂SO₄ com 45% de saturação. A solução obtida foi mantida sob agitação durante 30 minutos, seguida de repouso por 24 horas para posteriormente ser centrifugada a uma rotação de 10.000 rpm/ 15 min à temperatura de 4°C. O precipitado foi coletado e dialisado contra água deionizada ultrapura por um período de 24 horas. Após a diálise o anticorpo foi liofilizado.

Para determinação da concentração, o anticorpo liofilizado foi pesado e diluído em 1 mL de tampão fosfato. A concentração de proteínas foi determinada usando espectrofotômetro (NanoDrop® ND- 1000 UV-VIS). A verificação do processo de purificação e integridade do anticorpo foi avaliada por ensaio de aglutinação em lâmina, conforme método do fabricante (Difco™).

O Anticorpo primário foi conjugado com a enzima peroxidase de raiz forte - Horseradish (HRP) (Sigma-Aldrich®) conforme metodologia de Avrameas (1969). A conjugação foi realizada pela dispersão da enzima peroxidase em solução do anticorpo primário com concentração conhecida e adição de 2 µL de glutaraldeído 25%. A massa da enzima peroxidase utilizada foi três vezes a concentração do anticorpo. A solução foi mantida em repouso durante duas horas e em seguida a solução de anticorpo conjugado, foi submetida a diálise.

4.4 Montagem e resposta do biossensor

4.4.1 Montagem do biossensor

A superfície de ouro foi modificada empregando a técnica de monocamadas auto-organizadas (SAMs). Os eletrodos descartáveis foram imersos em solução etanólica de cisteamina (cis) 10 mM durante 3 horas, lavados com água destilada e secos a temperatura ambiente. Em seguida, a proteína A (protA) 7,5 mg mL⁻¹ de *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich®) foi adicionada a uma solução de N-hidroxissuccinimida/ N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (Sigma-Aldrich®) (EDC/NHS) (2mM/5mM) durante 1 hora para ativação

de seus grupos carboxílicos. Posteriormente, o eletrodo modificado com cisteamina foi imerso em solução de proteína A ativada durante 1 hora. Após cada etapa de imersão o eletrodo foi lavado com solução tampão fosfato (PBS) 10 mM (pH 7,4). O eletrodo modificado cis-protA foi, então, imerso *overnight* em solução de anticorpo primário anti-*Salmonella* (Ac) 2 mg mL⁻¹. Em seguida as ligações inespecíficas do eletrodo cist-protA-Ac foram bloqueadas com solução de albumina de soro bovino 1% (Sigma-Aldrich®) durante uma hora (ALEXANDRE et al., 2018).

4.4.2 Resposta analítica

As análises eletroquímicas foram realizadas utilizando como superfície de base para a montagem do biossensor eletrodos impressos de ouro da Dropsense - C220AT®, com área de aproximadamente 0,50 cm². Estes eletrodos incluem em sua estrutura o eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e o eletrodo auxiliar. Foi empregado um potenciostato/galvanostato (Autolab/PGSTAT12) com o software NOVA (v.4.9.007)

O biossensor foi imerso em uma cultura de *S. Typhimurium* ATCC 51812 contendo diluições conhecidas expressas em UFC.mL⁻¹ durante 1 hora, e em seguida em solução de anticorpo conjugado (0,7 mg mL⁻¹) com a enzima peroxidase HRP por 1 hora.

A resposta analítica foi gerada em solução tampão PBS 10 mM (pH 7,4) em presença de H₂O₂ 300 mM e hidroquinona 3 mM. As respostas voltamétricas foram obtidas após a adição de peróxido de hidrogênio e hidroquinona. Os estudos de cronoamperometria foram realizados a potencial constante de 75 mV por 120 s até estabelecimento de uma linha de base.

4.4.3 Parâmetros de desempenho

4.4.3.1 Avaliação em condição tamponante

A avaliação do desempenho do biossensor foi realizada a partir da construção de uma curva de resposta amperométrica em diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (0 a 10³ UFC.mL⁻¹) diluídas em tampão PBS 10 mM (pH 7,4). Para a interpretação da resposta analítica (positiva/ negativa) um ponto de corte (*cut off*) foi determinado.

Ponto de corte

Com base no limite estabelecido em termos de concentração do analito para determinada amostra, uma relação entre esse limite e sua resposta instrumental foi estabelecida de acordo com Pulido et al. (2002). As respostas amperométricas obtidas na presença de *S. Typhimurium* foram comparadas com a resposta instrumental estabelecida para o controle negativo (ausência de patógeno) acrescida de um desvio padrão e um valor estatístico t. Conforme Eq. (1), as respostas amperométricas acima do ponto de corte foram consideradas positivas.

$$\text{ponto de corte} = \bar{X} + t(\alpha, v) \cdot SD \quad (1)$$

Onde, \bar{X} é a média dos sinais dos brancos da amostra, $t(\alpha, n-1)$ é o valor estatístico t tabular unilateral em um determinado nível de significância (α). Dado que, n é o tamanho da amostra (n=5), α (95%) e SD é o desvio padrão amostral dos sinais dos brancos da amostra.

Os parâmetros de desempenho avaliados foram probabilidade de detecção (POD) e precisão (DPR)(AOAC, 2012; INMETRO, 2018; PULIDO et al., 2002).

POD

Conforme orientações da AOAC (2012), o POD foi estabelecido como a razão entre o número de respostas positivas (X) pelo número total de respostas (N) conforme Eq. (2), considerando cada caso específico. O intervalo de confiança corresponde ao método de pontuação de Wilson não corrigido, modificado para $x = 1$ e $x = N - 1$ para melhorar precisão de cobertura no limite (Anexo 1).

$$POD = X / N \quad (2)$$

Precisão

Conforme orientações do INMETRO (2018), a precisão foi determinada por meio do cálculo do Desvio Padrão Relativo (DPR), expresso na Eq. (3).

$$DPR = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100 \quad (3)$$

4.4.3.2 Avaliação em leite

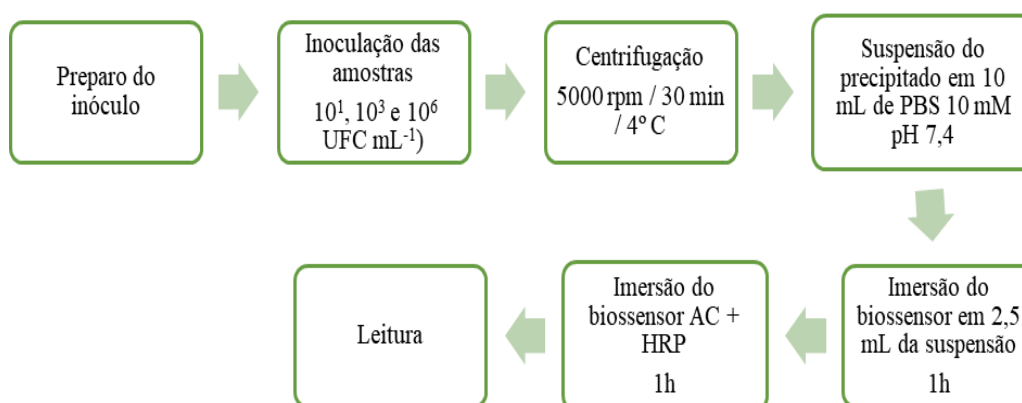
4.4.3.2.1 Análise microbiológica

Amostras de leite cru e UHT foram avaliadas quanto a presença de possíveis interferentes em sua microbiota, através de análises microbiológicas. Para tanto, foi realizada a pesquisa de *Listeria sp.*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e coliformes a 45 °C. A avaliação seguiu metodologia do BAM.

4.4.3.2.2 Preparo e análise das amostras

Para avaliação do biossensor, amostras de leite cru e UHT integral foram contaminadas com cepas de *S. Typhimurium*. Para isso, foram utilizadas diferentes concentrações da cultura (10^1 , 10^3 e 10^6 UFC mL⁻¹). As amostras foram centrifugadas para retirada da gordura, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi suspenso em 10 mL de tampão PBS e homogeneizado em vórtex por 1 min. O dispositivo foi imerso na solução por 1 h e posteriormente lavado com tampão PBS. Em seguida, foi imerso em solução de anticorpo conjugado à enzima peroxidase (HRP) por 1 h. A resposta eletroquímica foi obtida aplicando potencial constante de 75 mV por 120 s em solução tampão PBS 10 mM (pH 7,4) na presença de H₂O₂ 300 mM e hidroquinona 3 mM (ALEXANDRE et al., 2018).

Figura 1 – Análise de leite cru e UHT pelo biossensor



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificação do efeito da matriz, o biossensor foi avaliado em solução tampão PBS 10 mM (pH 7,4), leite cru e leite UHT contaminados com *Salmonella* na concentração de 10^6 UFC mL⁻¹. A análise se deu inicialmente sem a etapa de centrifugação. Posteriormente, para análise do efeito da gordura, as amostras de leite foram caracterizadas quanto ao teor de lipídeos antes e após o processo de desnatagem, segundo metodologia de Gerber (BRASIL, 2006).

Em seguida, foram novamente analisadas pelo dispositivo.

4.4.4 Parâmetros de validação em leite

Foram avaliadas 10 amostras de leite cru e UHT integral. As amostras foram previamente contaminadas com cepas de *S. Typhimurium* ATCC 51812 em diferentes níveis de inoculação e avaliadas pelos métodos alternativo (biossensor) e de referência – (BAM) (AOAC, 2012; FDA, 2015; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002; INMETRO, 2018).

Os ensaios realizados para pesquisa de *Salmonella* sp. foram realizados em quintuplicata. Foram coletadas assepticamente alíquotas de 25 mL do leite, contaminadas com inóculos de concentrações conhecidas e diluídas em 225 mL de caldo lactosado estéril, seguidas de homogeneização e repouso por 60 min para posterior ajuste de pH em $6,8 \pm 0,2$. A incubação para o pré-enriquecimento foi realizada a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. A etapa de enriquecimento foi realizada nos meios de cultura caldo tetrionato e caldo Rappaport-Vassilidis modificado. Foi inoculado 1 mL do caldo lactosado em 10 mL caldo tetrionato e incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por $24 \pm 2 \text{ h}$. Em paralelo 0,1 mL do caldo lactosado foi inoculado em 10 mL do caldo Rappaport-Vassilidis modificado e incubado a $42 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ em banho termostático. O crescimento obtido na etapa de enriquecimento foi submetido ao plaqueamento seletivo diferencial nos meios de cultura, ágar entérico de Hecktoen, ágar bismuto sulfito e ágar xilose lisina desoxicolato incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. As colônias típicas foram inoculadas em ágar tríplice açúcar ferro e ágar lisina ferro a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ e submetidas aos testes bioquímicos e sorológicos.

Para avaliação do desempenho do biossensor, as amostras de leite cru e UHT foram contaminadas com inóculos obtidos por meio de diluições seriadas. Cada nível de inoculação seguiu as orientações da AOAC e foram: controle negativo, fracionadas 1:2 e 1:3, 10^1 UFC.mL^{-1} (POD) e 10^3 UFC.mL^{-1} . Vale ressaltar ainda que, conforme exigência da AOAC, foram realizadas cinco repetições para cada nível de inoculação e o menor nível referente ao POD foi fracionado (1:2 e 1:3) (AOAC, 2012; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002). O desempenho do biossensor foi avaliado considerando os seguintes parâmetros: taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, sensibilidade e especificidade. As definições e cálculos seguiram as orientações da AOAC, conforme Eq. (4), (5), (6) e (7). Os dados do estudo foram inseridos conforme apresentado na Tabela 4 para cálculo dos indicadores de desempenho. Este cálculo foi feito para cada nível de inoculação (AOAC, 2012; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002).

Tabela 4 – Cálculo dos indicadores de desempenho do biossensor.

Resultado do método de referência	Resultado do método alternativo		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	N11 (+ +)	N12 (+ -)	N•1
Negativo	N21 (- +)	N22 (- -)	N•2
Total	N•1	N•2	N = N1• + N2• ou N•1 + N•2

N = Número de resultados em uma célula em particular, onde o primeiro número subscrito é a linha e o segundo número subscrito é a coluna.

N11 = Linha 1, coluna 1 = Número de amostras positivas pelo método de referência e pelo método alternativo.

N12 = Linha 1, coluna 2 = Número de amostras positivas pelo método de referência e negativas pelo método alternativo.

N21 = Linha 2 coluna 1 = Número de amostras negativas pelo método de referência e positivas pelo método alternativo.

N22 = Linha 2 coluna 2 = Número de amostras negativas pelo método de referência e pelo método alternativo.

N1• = Linha 1 total = Total de amostras positivas pelo método de referência.

N2• = Linha 2 total = Total de amostras negativas pelo método de referência.

N•1 = Coluna 1 total = Total de amostras positivas pelo método alternativo.

N•2 = Coluna 2 total = Total de amostras negativas pelo método alternativo.

Fonte: FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS (2002)

Sensibilidade

$$(p+) = N11 / N1• \quad (4)$$

Especificidade

$$(p-) = N22 / N2• \quad (5)$$

Taxa de falsos positivos

$$(pf+) = N21 / N2• = 1 - \text{especificidade} \quad (6)$$

Taxa de falsos negativos

$$(pf-) = N12 / N1• = 1 - \text{sensibilidade} \quad (7)$$

4.5 Estocagem do biossensor

Os dispositivos foram mantidos a seco e em solução á temperatura refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C) por 24 h, afim de verificar a melhor condição de estocagem. O desempenho do biossensor foi avaliado em amostras de leite UHT contaminado com *S. Typhimurium* (10^6 UFC.mL⁻¹).

Para análise da estabilidade 240 eletrodos tiveram sua superfície modificada pela

técnica de automontagem (PIMENTA-MARTINS et al., 2012) e foram preparados para a detecção de *Salmonella*. Após formação das ligações cist-protA-Ac-bsa, os eletrodos foram imersos em solução comercial estabilizante para anticorpos (Sigma-Aldrich®) e em solução formulada composta por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, Azida 0,2%, BSA 1mM, PBS 1mM. Posteriormente, foram estocados por 120 dias em condição refrigerada (4°C) e umidade relativa de 14% e temperatura ambiente (25°C) e umidade relativa de 69%. Após 15; 30; 60; 90 e 120 dias respectivamente, o desempenho do biossensor foi avaliado em amostras de leite UHT contaminadas com *S. Typhimurium* em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. As amostras de leite integral foram centrifugadas (5000 rpm a 4 °C por 30 min) para retirada da gordura e o precipitado foi suspenso em PBS (pH 7,4). Após contato com o leite, o biossensor foi imerso em solução de anticorpo conjugado com a enzima peroxidase HRP por 1 hora. A resposta eletroquímica foi obtida conforme descrito no item 4.4.2.

4.6 Análise estatística

A análise estatística das correntes amperométricas obtidas pelo biossensor para as diferentes concentrações de *S. Typhimurium*, considerando $p \leq 0,05$, foi realizada utilizando o programa Statistic versão 13 (Dell).

As análises da validação foram realizadas com cinco eletrodos para os níveis controle negativo, maior nível de inoculação e para o limite de detecção, o qual foi fracionado em 2 diluições (1:2 e 1:3). Os dados obtidos para a resposta do biossensor e pelo método convencional foram analisados conforme descrito pela AOAC (Apêndice 1), através da diferença de probabilidade de detecção (dPOD) entre os métodos avaliados (AOAC, 2012; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002).

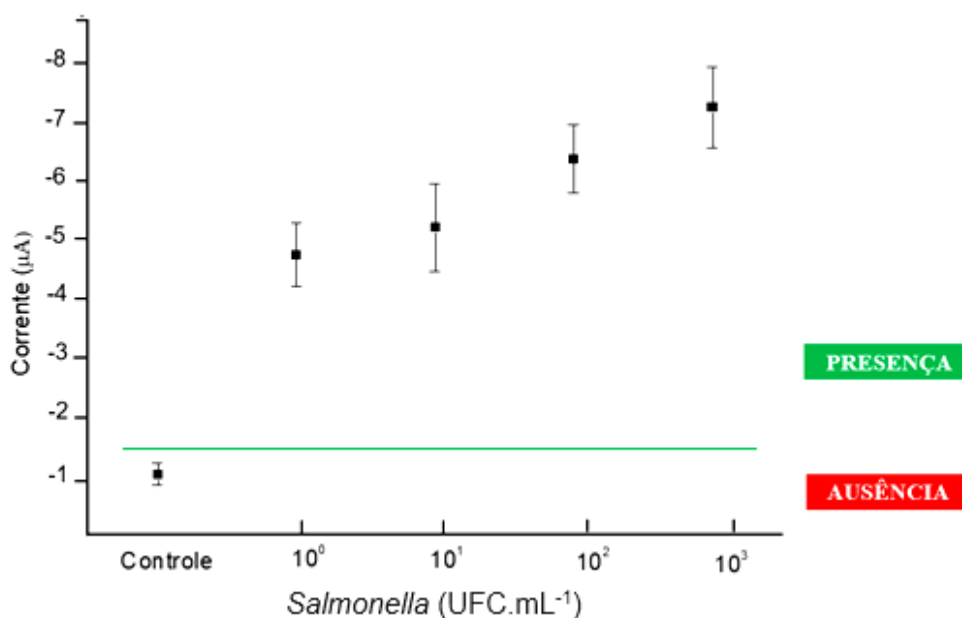
Nos dados correspondentes à estabilidade do biossensor utilizou-se o delineamento em parcelas subdivididas no tempo. Os dados foram transformados em \sqrt{x} para aproximar os dados da distribuição normal. A análise de variância foi realizada usando o programa Statistic versão 13 (Dell). Intervalos de confiança foram estabelecidos ao nível de 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros de desempenho em condição tamponante

Primeiramente, foram realizados os testes de avaliação do desempenho do biossensor em solução tampão e posteriormente em amostras de leite. A construção da curva de resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (Figura 2) permitiu estabelecer uma relação entre o sinal da corrente amperométrica (μA) e a concentração do analito (UFC.mL^{-1}). O desvio padrão está apresentado para $n = 3$ com diferença significativa entre o controle (0) e as concentrações (1 a 10^3 UFC mL^{-1}) aplicando $p \leq 0,05$.

Figura 2— Curva de resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (0 a 10^3 UFC mL^{-1}). Resposta analítica em tampão PBS 10 mM (pH 7,4) com H_2O_2 300 mM e hidroquinona 3 mM a um potencial de 75 mV por 120 s.



Fonte: Elaborada pelo autor

Todas as concentrações (1 a 10^3 UFC.mL^{-1}) foram preparadas com adição do inóculo ao tampão PBS e confirmadas por contagem padrão em placa. Todas as concentrações avaliadas apresentaram variação de corrente elétrica acima do ponto de corte, indicando uma resposta positiva para a presença de *Salmonella*.

Pulido et al. (2002) em estudo sobre estimativa da incerteza de respostas binárias (presença / ausência) de um sensor qualitativo, definiu que uma vez correlacionado o sinal instrumental do limite de especificação com a concentração do analito, um limite de corte deve ser definido. Dado que para pesquisa de *Salmonella* este limite de especificação é a ausência do patógeno, o ponto de corte foi definido sobre esta condição (ANVISA, 2001). O ponto de corte obtido pelo biossensor foi de $1,67 \mu\text{A}$, resposta amperométrica correspondente

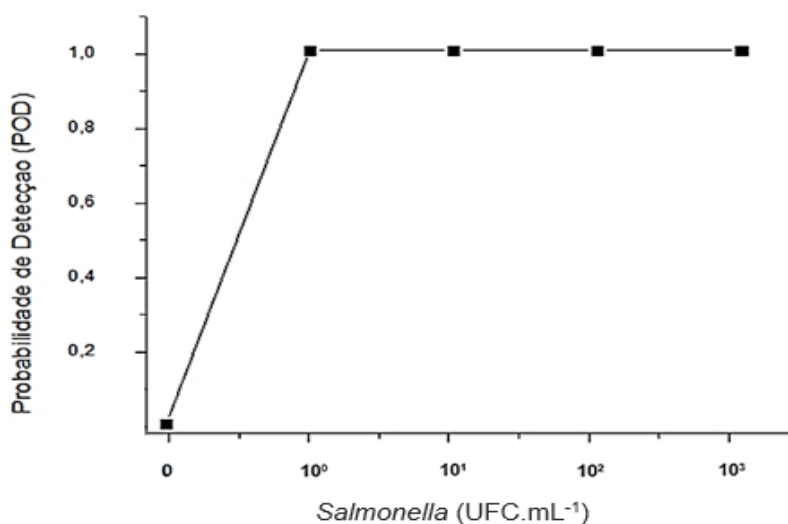
a amostra sem o analito. De fato, na concentração de 1 UFC. mL⁻¹ é possível observar um sinal amperométrico três vezes superior ao obtido pelo ponto de corte, indicando assim uma resposta positiva para presença do analito na menor concentração avaliada.

5.1.1 Probabilidade de Detecção (POD)

Quando se objetiva avaliar o desempenho de um método alternativo qualitativo deve-se utilizar critérios estatísticos contidos em protocolos de validação aprovados (AOAC, 2012; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002). De acordo com AOAC (2012), a POD nos fornece a probabilidade de um método qualitativo detectar o analito, dada uma determinada matriz e em nível de inoculação ou concentração do analito. Este valor probabilístico é expresso em valores que variam de 0 a 1, indicando a mínima e a máxima probabilidade de detecção na concentração avaliada, respectivamente. Com os valores obtidos experimentalmente, obteve-se a curva de probabilidade de detecção (POD), ferramenta que representa graficamente os resultados positivos do método qualitativo estabelecido em relação à concentração, harmonizando os conceitos e parâmetros estatísticos entre a validação quantitativa e qualitativa do método (BRUNELLE, 2016; GONDIM et al., 2017; ROHDE et al., 2017).

Para todas as concentrações o dispositivo apresentou POD=1, indicando a máxima sensibilidade para detecção do patógeno, inclusive na menor concentração de *Salmonella* avaliada, 1 UFC. mL⁻¹ (Figura 3).

Figura 3 – Probabilidade de detecção (POD) para diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (0 a 10³ UFC mL⁻¹) em solução tampão fosfato 10 mM pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor

Métodos rápidos para detecção de *Salmonella* sp. baseados em ensaios imunológicos (ELISA) apresentam limite de detecção na faixa de 10^4 a 10^5 UFC. mL⁻¹, enquanto que para ensaios baseados em ácidos nucleicos (PCR) a menor concentração detectada é tipicamente de 10^4 UFC mL⁻¹, com a etapa de pré-enriquecimento (LEE et al., 2015; SILVA et al., 2018). Em comparação a estes métodos o biossensor apresentou-se mais eficiente. Melo et al. (2016) e Salam et al. (2013) desenvolveram biossensores para detecção de *S. Typhimurium* com capacidade de detecção de 10 UFC mL⁻¹ e 20 UFC mL⁻¹, respectivamente. Utilizando eletrodos impressos, Alexandre et al. (2018) obtiveram o valor de 10 UFC mL⁻¹ para detecção de *Salmonella* em leite e em condições tamponantes. Fulgione (2018) em análise de *S. Typhimurium*, identificou a presença da bactéria na concentração de 10^0 UFC mL⁻¹, porém com necessidade da etapa de pré-enriquecimento da amostra. Ao compararmos o resultado obtido no presente estudo a outros trabalhos envolvendo biossensores para detecção de *Salmonella*, a eficiência do dispositivo é notória por apresentar elevada probabilidade de detecção do patógeno a mínimas concentrações, não requerer etapa de pré-enriquecimento da amostra e apresentar tempo de resposta inferior aos métodos usualmente empregados (FULGIONE et al., 2018; LEE et al., 2015; SALAM; TOTHILL, 2009; SU et al., 2011; TREVISANI et al., 2019).

5.1.2 Precisão – repetibilidade

Este parâmetro indica o quão precisa é a resposta analítica fornecida pelo biossensor a uma dada concentração do analito. O cálculo deste parâmetro foi realizado para cada concentração avaliada (Tabela 5) e seguiu as recomendações do INMETRO (2018), conforme expresso na eq. (2)

Tabela 5 – Desvio padrão relativo (DPR) calculado para as respostas amperométricas do biossensor para as concentrações de *S. Typhimurium* testadas em solução tampão 10mM pH 7,4.

Concentração (UFC mL ⁻¹)	10^0	10^1	10^2	10^3	Média
DPR (%)	11,4	14,4	9,2	9,41	12,5

Fonte: Elaborada pelo autor

O DPR obtido pelo biossensor variou de 9,2 % a 14,4 % e apresentou valor médio de 12,5%. A metodologia de montagem apresentou padronização satisfatória em sua execução, no entanto, as inúmeras etapas de montagem do sensor são fontes de variações e podem ter contribuído para este valor de DPR. Melo et al. (2015) no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para detecção de *Salmonella* utilizando eletrodos convencionais como base, obtiveram um DPR médio de 9,7%. Dessa forma, considerou-se o DPR obtido pelo biossensor do presente trabalho, compatível com a metodologia empregada no desenvolvimento do dispositivo.

5.2 Parâmetros de desempenho em leite

5.2.1 Diagnóstico microbiológico das amostras

As amostras de leite cru e UHT foram submetidas inicialmente às análises microbiológicas para verificar a presença de *Salmonella* e de microrganismos que viessem a interferir no desempenho do dispositivo. Os resultados das análises microbiológicas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Análises microbiológicas das amostras leite cru e leite UHT

Amostra	<i>Listeria</i> <i>sp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> (UFC/mL)	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (UFC/mL)	<i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	Coliformes a 45 °C (NMP/mL)
Leite cru	Ausência	< 10	<10	Ausência	1,1 x 10 ³
Leite UHT	Ausência	< 10	<10	Ausência	< 3

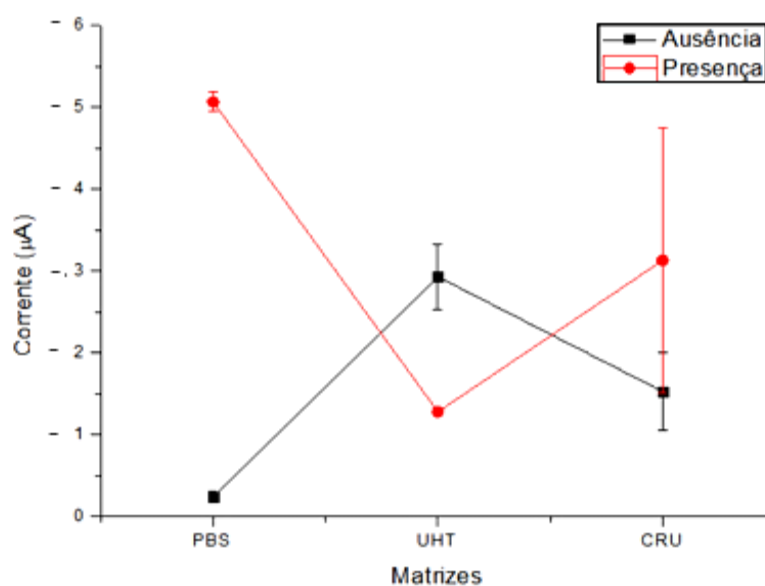
Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.2 Pré-tratamento das amostras

No meio científico, é comum se referir à avaliação do biossensor em condições consideradas otimizadas, sendo seu desempenho em amostras reais pouco explorado (LEE et

al., 2015). Neste contexto, objetivando verificar a eficácia do dispositivo em uma matriz complexa, onde a presença de possíveis interferentes poderia alterar o seu desempenho, amostras de leite UHT, leite cru e tampão PBS 10mM (pH 7,4) foram avaliadas na presença e ausência de *S. Typhimurium* (10^6 UFC.mL⁻¹), conforme explicitado na Figura 4.

Figura 4 – Resposta amperométrica do biossensor na presença e ausência de *S. Typhimurium* (10^6 UFC mL⁻¹) em leite integral UHT, leite cru e solução tampão (PBS). O desvio padrão está apresentado para n = 3.



Fonte: Elaborada pelo autor

As respostas amperométricas obtidas pelo biossensor em amostras de leite cru e UHT integral demonstraram que o dispositivo não foi eficiente na detecção de *S. Typhimurium*, pois não foi possível diferenciar as amostras contaminadas do controle negativo (sem o analito) de forma coerente. No entanto, como visto previamente em condição otimizada, a resposta binária foi coerentemente obtida, confirmando a presença do patógeno e evidenciando o efeito da matriz na resposta amperométrica para as demais amostras. De fato, a matriz pode conter componentes que influenciam diretamente no desempenho do dispositivo, aumentando ou reduzindo o sinal e assim, comprometendo o resultado (LEE et al., 2015). Poucos biossensores são avaliados em matrizes alimentares, porém há trabalhos reportados na literatura que sinalizam a presença de componentes como gorduras, proteínas, células e metabólitos celulares como possíveis interferentes na resposta analítica (KUTTER; HARTMANN; SCHMID, 2006; LEE et al., 2015; MELO et al., 2018; POLACZYK et al., 2008).

A gordura é um dos componentes presentes em laticínios que pode impedir o estabelecimento coerente da relação concentração/sinal, levando a resultados inconsistentes conforme apresentado nas respostas da análise. Melo (2015) em avaliação do desempenho de um biossensor para detecção de *Salmonella* em leite integral, demonstrou que a gordura interferiu na resposta do dispositivo. Este resultado foi similar ao observado neste trabalho.

No intuito de reduzir a influência do interferente gordura na resposta do biossensor, utilizou-se o processo de centrifugação a baixa temperatura. Nessa condição os glóbulos de gordura maiores são unidos às aglutininas e ficam presos a parede do tubo da centrífuga. Se os glóbulos forem menores é necessária uma maior quantidade de aglutininas para ligá-los.

As amostras de leite cru e UHT foram analisadas quanto ao teor de gordura antes e após esta etapa. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 7. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados apresentaram diferença significativa aplicando $p \leq 0,05$.

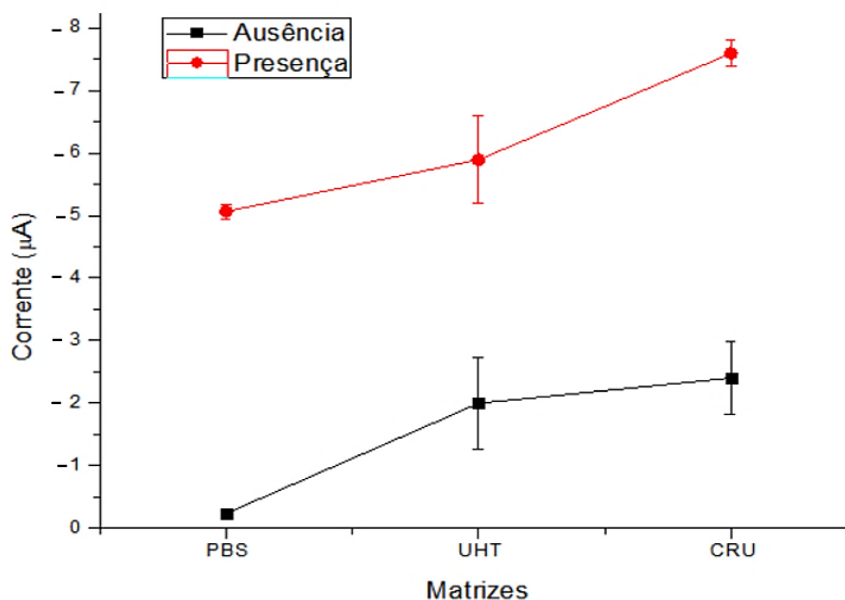
Tabela 7 – Média dos valores de gordura (g/100g) das amostras de leite UHT integral e cru antes e após centrifugação, segundo metodologia de Gerber.

Leite UHT			Leite Cru		
Integral (%)	Após centrifugação (%)	Gordura retirada (%)	Integral (%)	Após Centrifugação (%)	Gordura retirada (%)
3,1	0,3	2,8	2,4	0,2	2,2

Fonte: Elaborada pelo autor

Conforme definido pela Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018, o leite é considerado desnatado quando seu teor de gordura máximo é de 0,5g/100g (zero vírgula cinco gramas por cem gramas). Dessa forma, podemos afirmar que o processo de centrifugação foi eficiente para retirada da gordura. Com o intuito de observar o comportamento do biossensor, as amostras com teor de gordura reduzido foram contaminadas com *S. Typhimurium* (10^6 UFC.mL⁻¹) e avaliadas pelo dispositivo. As amostras de leite cru e UHT foram submetidas a centrifugação. O desvio padrão está apresentado para $n = 3$ (Figura 5).

Figura 5 – Resposta amperométrica do biossensor na presença e ausência de *S. Typhimurium* (10^6 UFC.mL⁻¹) em leite UHT e cru centrifugados e em solução tampão PBS 10mM pH 7,4.



Fonte: Elaborada pelo autor

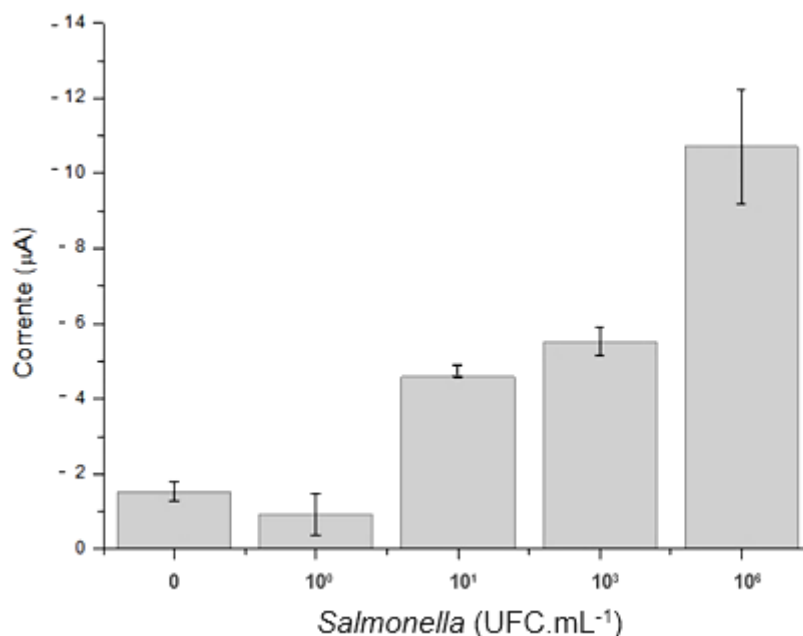
Verificou-se que a variação da corrente elétrica na presença do patógeno foi diferente das amostras sem o patógeno para todas as amostras avaliadas. Na presença de *Salmonella* a corrente foi de $-7,59 \mu\text{A}$; $-5,89 \mu\text{A}$ e $-5,06 \mu\text{A}$ para leite cru, leite UHT, e solução tampão (PBS), respectivamente, enquanto na ausência do patógeno a corrente de redução mínima obtida foi de $-2,5 \mu\text{A}$. O biossensor foi capaz de detectar o patógeno em todas as amostras contaminadas com *Salmonella* analisadas.

5.2.3 Detecção de *Salmonella*

5.2.3.1 Amplitude de corrente e POD

A performance do biossensor em amostras de leite cru e UHT, para diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (0 , 10^0 , 10^1 , 10^3 , 10^6 UFC. mL⁻¹) está representada na Figura 6. As amostras foram contaminadas e centrifugadas para a remoção de parte da gordura do leite. Ensaios prévios realizados indicaram que este procedimento não alterou a concentração de bactérias.

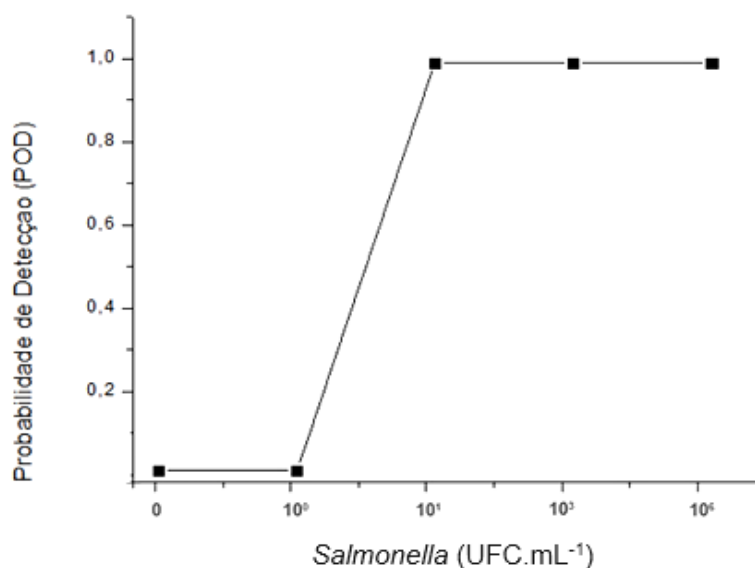
Figura 6 – Resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de *S. Typhimurium* em leite UHT. Resultados obtidos em tampão PBS 10mM (pH 7,4) na presença de H₂O₂ (300 mM) e hidroquinona (3 mM), potencial 75 mV por 120 s.



Fonte: Elaborada pelo autor

O ponto de corte obtido pelo biossensor para leite UHT foi de -2,27 µA. Sendo assim, o dispositivo foi capaz de sinalizar a presença do patógeno em todas as concentrações acima de 10¹ UFC. mL⁻¹. A curva de probabilidade de detecção (POD) para leite UHT (Figura 7) demonstrou que todas as replicatas assertivamente conseguiram identificar o patógeno, POD=1, a partir de 10¹ UFC.mL⁻¹, sendo essa portanto, a menor concentração de *Salmonella* detectada pelo dispositivo. Comparativamente, em condições otimizadas, a menor concentração detectada foi 10⁰ UFC. mL⁻¹. Este resultado era esperado, dado que a resposta analítica se deu em tampão PBS, sistema livre de possíveis interferentes e que provavelmente facilitou o reconhecimento do antígeno, levando a uma maior sensibilidade. No entanto, para uma matriz complexa como leite, a detecção de 10¹ UFC. mL⁻¹ é um resultado bastante expressivo, pois comparado a métodos alternativos atuais, a POD apresentada pelo biossensor indica um dispositivo mais sensível, rápido e sem necessidade da etapa de pré-enriquecimento.

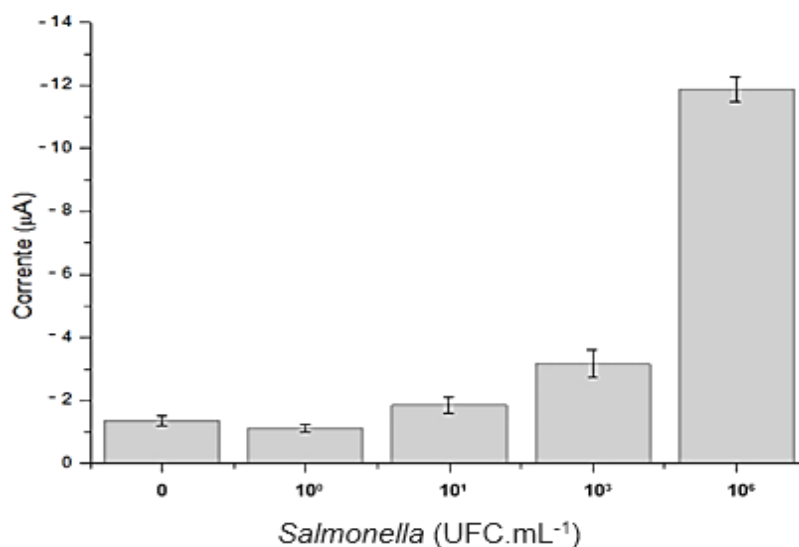
Figura 7 – Probabilidade de detecção (POD) para diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (0, 10^0 , 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC mL⁻¹) em leite UHT. Os valores estão representados para n=5.



Fonte: Elaborada pelo autor

Analisando a performance do dispositivo em leite cru, o biossensor apresentou ponto de corte de $-1,78 \mu\text{A}$, sendo a presença do patógeno detectada a partir da concentração 10^1 UFC. mL⁻¹ (Figura 8).

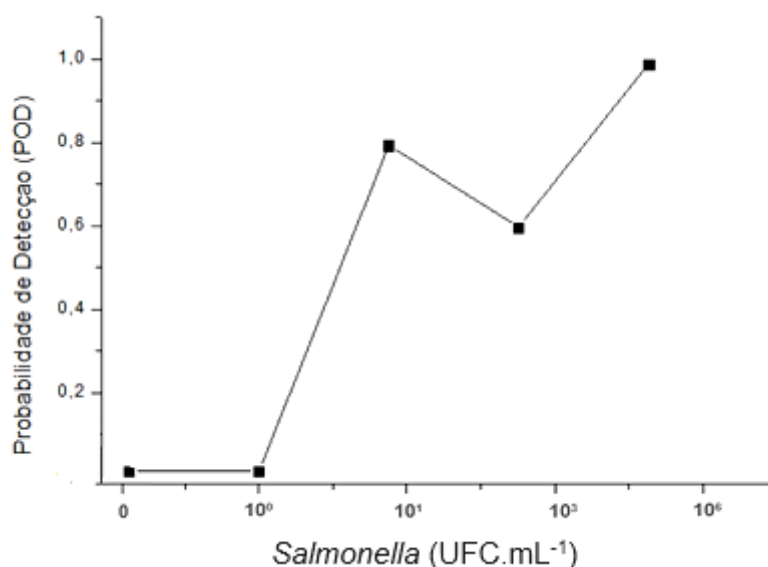
Figura 8 – Resposta amperométrica do biossensor em diferentes concentrações de *S. Typhimurium* em leite cru. Resultados obtidos em tampão PBS 10mM (pH 7,4) na presença de H₂O₂ (300 mM) e hidroquinona (3 mM), potencial 75 mV por 120 s.



Fonte: Elaborada pelo autor

Embora a presença de substâncias inibitórias (gorduras, proteínas, polissacarídeos, metais pesados, antibióticos e compostos orgânicos) presentes no leite possam reduzir a resposta amperométrica, o desempenho qualitativo permaneceu o mesmo apresentado pela matriz processada termicamente- UHT (KUTTER; HARTMANN; SCHMID, 2006; LEE et al., 2015). Quanto a probabilidade de detecção, as concentrações avaliadas estão representadas na Figura 9.

Figura 9 – Probabilidade de detecção (POD) para diferentes concentrações de *S. Typhimurium* (0, 10^0 , 10^1 , 10^3 e 10^6 UFC mL⁻¹) em leite cru. Os valores estão representados para n=5.



Fonte: Elaborada pelo autor

Segundo Cortinhas (2013) a produção de matérias primas de alta qualidade é um dos principais desafios para o aumento da competitividade do sistema agroindustrial do leite. Dessa forma, a qualidade do leite cru é um dos principais pré-requisitos para otimizar o processamento, rendimento e aceitabilidade dos derivados lácteos. Vale ressaltar ainda que especificamente para *Salmonella*, a legislação brasileira segue as normas internacionais, não havendo tolerância quanto à presença desta bactéria em alimentos, portanto, apenas a resposta binária positivo/negativo é suficiente para suprir as exigências legais (BRASIL, 2001).

5.3 Parâmetros de validação em leite

5.3.1 Avaliação dos parâmetros

Conforme exigência da AOAC, o nível referente a menor concentração de *Salmonella* detectada foi fracionada (1:2 e 1:3) com 5 repetições para cada nível (AOAC, 2012; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002). O desempenho do biossensor foi avaliado considerando os parâmetros: sensibilidade, taxa de falsos negativos, especificidade, taxa de falsos positivos e POD. As definições e cálculos seguiram as orientações da AOAC. Os dados do estudo foram inseridos na Tabela 4 conforme apresentado no item 4.4.4. O cálculo foi realizado para cada nível de inoculação (AOAC, 2012; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002). Os resultados para o cálculo dos parâmetros de desempenho do biossensor encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Comparação geral dos resultados obtidos pelo método de referência e pelo biossensor para análise de *Salmonella* sp. em leite cru e UHT.

Amostras	Nº de porções teste	Resultados Método de Referência		Resultados Biossensor		Comparação Referência x Biossensor			
		+	-	+	-	++	+ -	- +	--
Leite Cru	25	20	5	12	13	12	8	0	5
Leite UHT	25	20	5	7	18	7	13	0	5
Total	50	40	10	19	31	19	21	0	10

Resultados positivos (+); Resultados negativos (-); Resultados positivos para ambos os métodos (++); Resultados negativos para ambos os métodos (- -); Resultados positivos para o método de referência e negativo para o biossensor (+ -), respectivamente; Resultados negativos para o método de referência e positivo para o biossensor (- +), respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor

A sensibilidade indica a capacidade que um método apresenta, a um dado nível de inoculação, de detectar corretamente o analito e é expressa pelo número total de porções teste positivas confirmadas pelo biossensor em comparação ao total de porções positivas confirmadas pelo método de referência. A taxa de falso-negativos por sua vez, pode ser descrita como a probabilidade de uma amostra positiva pelo método de referência ser detectada como negativa pelo biossensor e pode ser relacionada com a sensibilidade através da Eq. (7), conforme descrito no item 4.4.4 (AOAC, 2003).

Tabela 9 – Resultados para sensibilidade e taxa de falso-negativos para o biossensor em comparação ao método de referência da FDA, para diferentes níveis de inoculação de *Salmonella* sp. em leite cru e UHT.

Níveis de inoculação (UFC.mL ⁻¹)	Leite Cru		Leite UHT	
	Sensibilidade	FN	Sensibilidade	FN
10 ³	100%	0	100%	0
10 ¹	100%	0	100%	0
Fracionada (1:2)	40%	60%	20%	80%
Fracionada (1:3)	0	100%	0	100%

FN, taxa de resultados falso-negativos.

Fonte: Elaborado pelo autor

Como observado na Tabela 9, o biossensor apresentou sensibilidade de 100% para os níveis de inoculação: 10¹ UFC.mL⁻¹ e 10³ UFC.mL⁻¹ para os dois tipos de leite avaliados. Para a concentração fracionada (1:2) a sensibilidade máxima foi de 40% e para a fracionada (1:3) o biossensor não detectou a presença do patógeno. A explicação para esse fato pode estar relacionada a baixa quantidade de *Salmonella* nas amostras analisadas, abaixo do POD do dispositivo (BRUNELLE, 2016; FULGIONE et al., 2018; KUSHIDA, 2005; MELO et al., 2016). Resultado similar foi observado também por Kushida (2005), ao fazer a comparação entre o desempenho de um método alternativo baseado em PCR e um método de referência. Neste estudo, o método alternativo apresentou um POD de 5,4 x 10² UFC.mL⁻¹, com pré-enriquecimento.

Embora a maioria dos métodos de detecção de *Salmonella* ainda recorra aos métodos convencionais culturais (pré-enriquecimento) para ampliar a população bacteriana, vale ressaltar que mesmo sem essa etapa, o dispositivo apresentou sensibilidade de 100% para a concentração 10 UFC.mL⁻¹. Este resultado é bastante interessante, pois o biossensor apresentou desempenho semelhante ao método padrão para uma das menores concentrações detectáveis do patógeno. Adicionalmente, nas concentrações a partir de 10 UFC.mL⁻¹ a taxa

de resultados falso-negativos foi nula. Testes considerados como sensíveis devem, de fato, apresentar baixo número de resultados falso-negativos (AOAC, 2002; COELHO, 2012).

A especificidade é expressa pela razão entre o número total de porções teste negativas analisadas pelo biossensor e o número total de porções teste negativas confirmadas pelo método de referência. A taxa de falso-positivo é a probabilidade de uma amostra negativa pelo método de referência ser detectada como positiva pelo método teste. Estes dois parâmetros, assim como a sensibilidade e taxa de falso-negativos, podem ser relacionados através da Eq. (6), conforme descrito no item 4.4.4. Neste trabalho, dado que o biossensor não detectou o patógeno abaixo do seu POD, a especificidade não foi determinada para os níveis fracionados. No entanto, para os níveis de inoculação: 10^3 UFC.mL⁻¹ e 10^1 UFC.mL⁻¹, para os dois tipos de leite avaliados a especificidade foi de 100% e a taxa de falso-positivo nula.

De acordo com a AOAC (2012), para a validação de um método qualitativo é necessário que um estudo de inclusividade e exclusividade seja realizado, para então, considerar o método como sensível e específico, respectivamente. Para realização do estudo de exclusividade, seria necessário pelo menos 30 cepas de Salmonella. Por sua vez, para o estudo da inclusividade, 100 cepas do patógeno. Por limitações financeiras, o presente estudo foi realizado com apenas uma cepa, *S. Typhimurium*. Dessa forma, embora os parâmetros sensibilidade e especificidade tenham sido calculados e apresentado bons resultados, o biossensor não pode ser considerado como um método alternativo validado pelo estudo pré-colaborativo. No entanto, este estudo de validação inicial demonstrou que o dispositivo apresentou eficiência e grande potencial para futura comercialização. Sugere-se assim, que em estudos futuros, um número maior de cepas possa ser utilizado e o processo de validação seja concluído.

5.3.2 Comparação com método de referência

O cálculo para comparação entre a probabilidade de detecção do método de referência (POD ref) e o biossensor (POD bio), foi realizado conforme recomendações da AOAC (2012) para cada nível de inoculação: controle negativo, 10^3 UFC.mL⁻¹, 10^1 UFC.mL⁻¹ e fracionadas a partir da concentração 10^1 UFC.mL⁻¹ (1:2 e 1:3). Foram realizadas cinco repetições para cada nível de inoculação (AOAC, 2012; FELDSINE; ABEYTA; ANDREWS, 2002). Os resultados obtidos para a análise em leite cru e leite UHT estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Comparação da probabilidade de detecção (POD) obtidos pelo método de referência (POD ref) e pelo biossensor (POD bio) em diferentes níveis de inoculação para análise de *Salmonella* sp. em leite cru e UHT.

Amostras	Nível de inóculo	Biossensor					Método de Referência				Comparação entre Métodos		
		N	X	POD bio	95% IC		X	POD ref	95% IC		dPOD bio/ref	95% IC	
					LI	LS			LI	LS		LI	LS
Leite Cru	Controle negativo	5	0	0	0	0,43	0	0	0	0,43	0,00	-0,43	0,43
	10 ¹	5	5	1	0,57	1,00	5	1	0,57	1	0,00	-0,43	0,43
	1:2	5	2	0,4	0,12	0,77	5	1	0,57	1	-0,60	-0,88	-0,03
	1:3	5	0	0	0	0,43	5	1	0,57	1	-1,00	-1,00	-0,39
	10 ³	5	5	1	0,57	1,00	5	1	0,57	1	0,00	-0,43	0,43
Leite UHT	Controle negativo	5	0	0	0	0,43	0	0	0	0,43	0,00	-0,43	0,43
	10 ¹	5	5	1	0,57	1,00	5	1	0,57	1	0,00	-0,43	0,43
	1:2	5	1	0,2	0,04	0,62	5	1	0,57	1	-0,80	-0,96	-0,19
	1:3	5	0	0	0	0,43	5	1	0,57	1	-1,00	-1,00	-0,39
	10 ³	5	5	1	0,57	1,00	5	1	0,57	1	0,00	-0,43	0,43

N, número de porções teste; x, número de porções teste positivas; POD, resultados positivos divididos por N; PODref, método de referência; PODbio, método alternativo (biossensor); IC, intervalo de confiança; LI, limite inferior e LS, limite superior.

Fonte: Elaborado pelo autor

Como observado na Tabela 10 o biossensor apresentou POD semelhante ao do método de referência, para os níveis de inoculação: controle negativo, 10¹ UFC.mL⁻¹ e 10³ UFC.mL⁻¹ para ambas amostras analisadas, leite cru e UHT.

Segundo Brunelle (2016), quando as 5 réplicas são avaliadas para o nível mais alto, se espera um POD = 1, pois todos resultados devem ser positivos. Por sua vez, para as 5 réplicas referentes ao controle negativo, se espera um POD = 0, indicando que não foi produzido resultados positivos. Podemos observar pela Tabela 10, que os resultados obtidos no presente trabalho para os níveis alto (10³ UFC.mL⁻¹) e controle negativo apresentaram POD = 1 e POD = 0, respectivamente, demonstrando conformidade com as exigências da AOAC (AOAC, 2012).

Conforme explicitado pela AOAC (2012), os dados apresentados foram analisados estatisticamente utilizando o dPOD, que é calculado pela diferença dos valores de POD dos métodos avaliados. Para estes valores, são associados intervalos de confiança (IC) a 95%, limites inferior e superior calculados conforme Anexo B e considerando-se estudos não pareados. Se o intervalo de confiança no dPOD incluir zero, a diferença entre os métodos comparados não será significativa, o que geralmente ocorre quando a dPOD é '0' (BRUNELLE, 2016; LABUDDE; HARNLY, 2012). Em outros casos, o intervalo de confiança deve ser observado para verificar a equivalência ou não dos métodos. Com base nesta informação, podemos observar que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo biossensor e o método de referência para os níveis de inoculação: controle negativo, 10^1 UFC.mL⁻¹ e 10^3 UFC.mL⁻¹, para os dois tipos de leites avaliados. Este resultado indica a equivalência e eficiência do biossensor na detecção do patógeno, para estas matrizes e nestes níveis de inoculação, em comparação com o método padrão. Por outro lado, para os níveis de inoculação fracionados, 1:2 e 1:3, os métodos diferiram estatisticamente (AOAC, 2012).

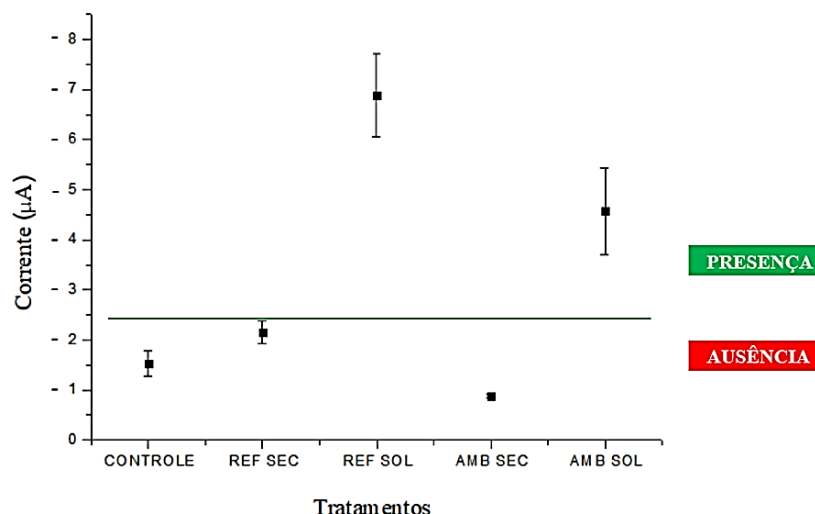
O biossensor apresentou desempenho similar ao método tradicional para detecção de *Salmonella* sp., nas concentrações 10^1 UFC.mL⁻¹ e 10^3 UFC.mL⁻¹. Este é um resultado muito interessante, pois além da capacidade de identificar a presença do patógeno em baixa concentração e em uma matriz complexa, o dispositivo requer menor quantidade de meios e reagentes e possui menor tempo de detecção que os métodos culturais.

5.4. Aspectos de estocagem

5.4.1 Condições de estocagem

O desempenho dos biossensores armazenados a seco e em solução, nas condições refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C), após 24 horas de armazenamento, foi avaliado em amostras de leite UHT contaminado com *S. Typhimurium* (10^6 UFC.mL⁻¹). O desvio padrão está apresentado para n= 5. Os resultados estão representados na Figura 10.

Figura 10 — Resposta amperométrica do biossensor em concentração conhecida de *S. Typhimurium* (10^6 UFC mL⁻¹) em leite UHT, após estocagem a seco e em solução, sob condição refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C).



REF SEC, biossensores estocados á seco e em condição refrigerada; REF SOL, biossensores estocados em solução e em condição refrigerada; AMB SEC, biossensores estocados á seco e em temperatura ambiente; AMB SOL, biossensores estocados em solução e em temperatura ambiente.

Fonte: Elaborada pelo autor

O ponto de corte do biossensor foi de $-2,28 \mu\text{A}$. Os dispositivos armazenados a seco, nas condições refrigerada (4°C) e ambiente (25°C), não foram capazes de detectar a presença do patógeno nas amostras de leite. Por outro lado, quando armazenados sob imersão, para as duas condições de temperatura, os dispositivos diferenciaram satisfatoriamente a amostra contaminada do controle negativo.

Na literatura, a escassez de trabalhos que tratem da estocagem de imunossensores é notória e não há soluções de armazenamento para tais dispositivos disponíveis comercialmente. No entanto, alguns trabalhos vêm sendo realizados no intuito de verificar o desempenho destes dispositivos após estocagem em solução. Adeloju e Moline (2001), avaliaram por 10 dias o armazenamento em solução tampão de um biossensor potenciométrico e observaram desempenho satisfatório na detecção de glicose. Pilas et al. (2018), desenvolveram um sistema biossensor à base de enzimas para determinação multiparamétrica de ácidos orgânicos em silagem e avaliaram sua estabilidade a seco e em solução tampão pelo período de 140 dias, obtendo como melhor condição o armazenamento a seco a -21°C .

Segundo Wang et al. (2007), a maior parte das soluções comerciais para anticorpos são formulados na forma líquida, por serem mais estáveis nessa condição. Dado que imunossensores possuem como biorreceptores moléculas de anticorpos responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, no presente trabalho uma solução estabilizante para anticorpos

foi utilizada como meio de armazenamento dos biossensores e demonstrou ser a melhor forma de estocagem, resultado expresso pelo desempenho exitoso dos dispositivos mantidos sob imersão. Assim, para avaliação da estabilidade ao longo do tempo, esta foi a condição escolhida.

5.4.2 Avaliação do desempenho ao longo do tempo

Um importante aspecto para a aplicação do biossensor a longo prazo é sua estabilidade durante o armazenamento, ou seja, a sua validade operacional. O estudo da sua resposta frente ao patógeno incluindo a perda do desempenho ao longo do tempo são importantes informações quando se visa uma aplicação comercial.

A estabilidade do biossensor foi avaliada em duas condições de solução estabilizante e de temperatura e com cinco medidas de tempo. A análise dos tratamentos ao longo do tempo foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA), considerando experimentos com parcelas subdivididas com medida repetida no tempo. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

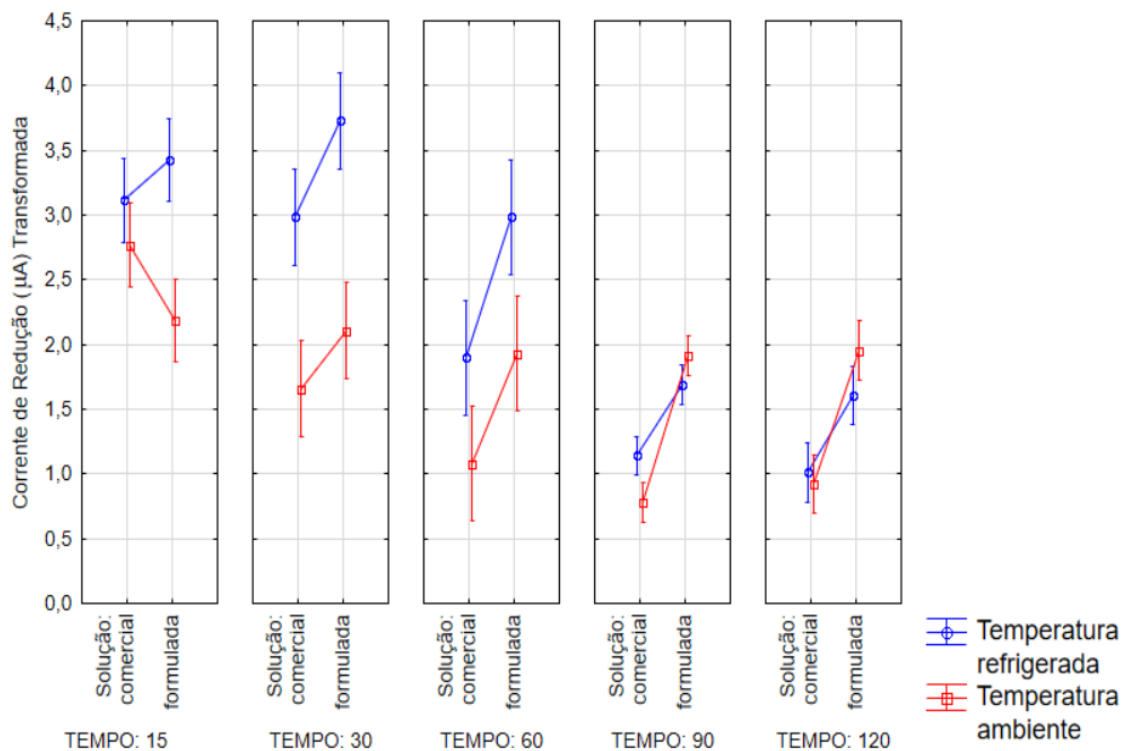
Tabela 11 – ANOVA dos dados transformados para a resposta do biossensor na presença de *S. Typhimurium* (10^6 UFC mL⁻¹) em leite UHT. (Continua)

Causas de Variação	GL	SQ	Alterar	F
Solução	1	9,48	9,48	68,70*
Temperatura	1	9,84	9,84	71,30*
Solução X Temperatura	1	0,04	0,04	0,30
Resíduo	16			
Tempo	4	38,30	9,58	88,80*
Tempo X Solução	4	3,90	0,97	8,98*
Tempo X Temperatura	4	8,70	2,17	20,11*
Tempo X Solução X Temperatura	4	1,83	0,45	4,21*
Resíduo	64	6,90	0,11	

Dados transformados \sqrt{x} . Alguns tratamentos apresentaram dados desbalanceados.
Fonte: Elaborada pelo autor

Verificou-se existir diferença significativa entre as duas soluções estabilizantes avaliadas, bem como, entre as duas temperaturas avaliadas. Um desdobramento da interação Tempo x Solução x Temperatura pode ser visto na Figura 11.

Figura 11– Intervalo de confiança das médias de resposta do biossensor na presença de *S. Typhimurium* (10^6 UFC mL^{-1}), valores transformados, para interação Tempo X Solução X Temperatura dos biossensores após estocagem em solução comercial estabilizante e solução formulada nos tempos 15; 30; 60 e 90 e 120 dias em condição ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}$) e refrigerada ($4\text{ }^\circ\text{C}$). O desvio padrão está apresentado para $n = 10$.



Fonte: Elaborada pelo autor

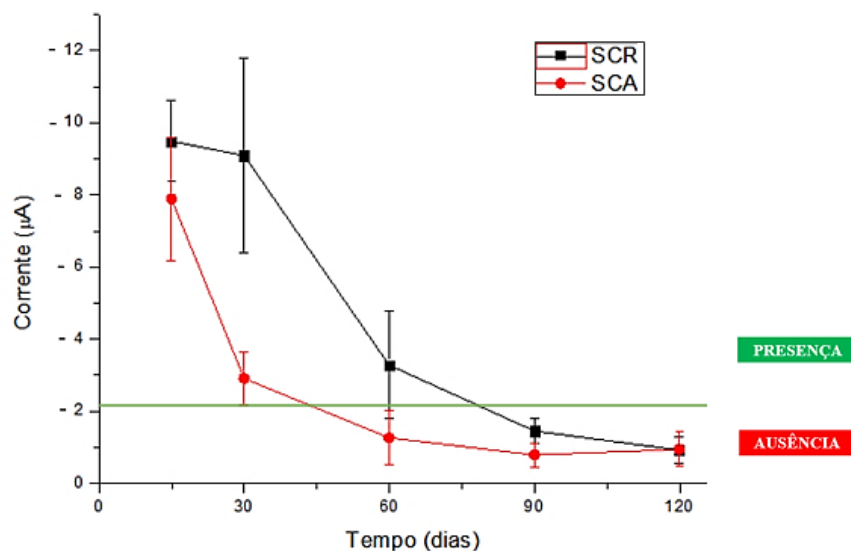
Durante o tempo de 15 dias, as respostas eletroquímicas dos biossensores armazenados em solução estabilizante comercial sob condição ambiente e refrigerada, não diferiram significativamente entre si. Porém, houve diferença significativa para a solução estabilizante formulada, a qual apresentou maior amplitude de corrente elétrica para a condição refrigerada. Com 30 dias de armazenamento, as soluções diferiam significativamente quanto á temperatura de estocagem e os biossensores mantidos sob refrigeração para ambas as soluções estabilizantes apresentaram maior sinal de corrente. A partir do tempo de 60, a solução estabilizante comercial apresentou intervalo de confiança similar nas duas condições de temperatura, enquanto a solução estabilizante formulada mantida sobre refrigeração manteve maior amplitude de corrente amperométrica. A partir do

tempo 90 dias o comportamento das soluções estabilizantes permaneceu constante até o fim do experimento, não houve diferença significativa quanto a estocagem nas duas temperaturas.

5.4.2.1 Avaliação do biossensor em solução estabilizante comercial

O desempenho do biossensor estocado por 120 dias em solução comercial estabilizante para anticorpos em condição refrigerada (SCR) e ambiente (SCA); solução formulada e condição refrigerada (SFR) e ambiente (SFA) foi avaliado e está representado na Figura 12. Um ponto de corte de corrente de $-2,2 \mu\text{A}$ foi estabelecido em amostras de leite UHT no intuito de verificar a resposta binária (positiva ou negativa do biossensor).

Figura 12 – Resposta amperométrica do biossensor em concentração conhecida de *S. Typhimurium* (10^6 UFC mL^{-1}) em leite UHT integral após estocagem em solução comercial durante 120 dias. O desvio padrão está apresentado para $n = 10$.



SCR, solução comercial refrigerada (4°C); SCA, solução comercial ambiente (25°C); tempos 15; 30; 60, 90 e 120 dias.

Fonte: Elaborada pelo autor

A resposta eletroquímica do biossensor armazenado sob condição ambiente durante 15 dias, não diferiu da obtida pelo dispositivo mantido sob refrigeração pelo mesmo período. Isso pode ser explicado pelo fato de soluções estabilizadoras de anticorpos aumentarem consideravelmente a vida útil dessas moléculas evitando a desnaturação e ação de proteases mantendo a atividade por longos períodos de tempo (RON; FREEMAN; SOLOMON, 1995; WANG et al., 2007)

Aos 30 dias de armazenamento, houve diferença significativa entre os biossensores mantidos nas duas temperaturas. O desempenho dos dispositivos armazenados em solução

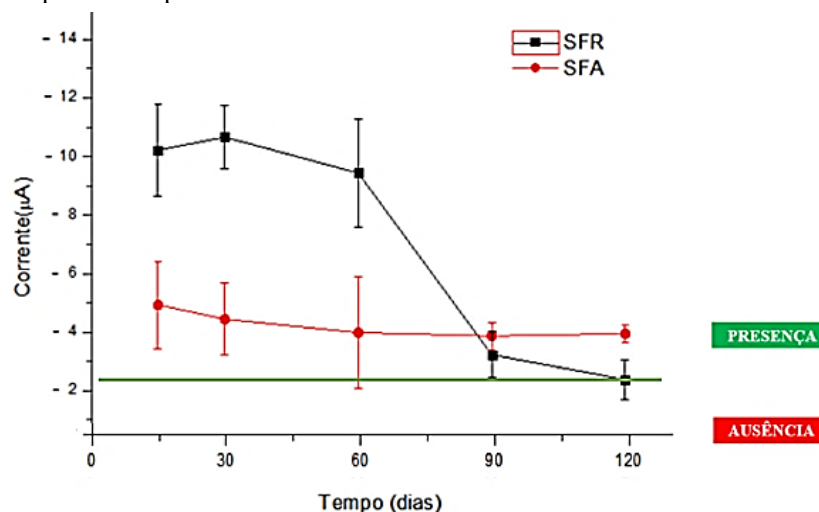
refrigerada se manteve estável e não diferiu da resposta obtida nos primeiros 15 dias. Para os mantidos a temperatura ambiente, verificou-se um declínio acentuado nas respostas eletroquímicas, podendo influenciar na sensibilidade. A temperatura é um dos principais fatores a ser considerado no armazenamento de soluções que contém biomoléculas (WANG et al., 2007). Notoriamente, a manutenção destas moléculas à temperatura ambiente influenciou diretamente no estado fisiológico das moléculas constituintes do biossensor, diminuindo o desempenho dos dispositivos.

Em contrapartida, mesmo com significativo declínio da resposta, os dispositivos mantidos sob refrigeração foram capazes de detectar o patógeno seguramente aos 60 dias. Segundo Reverberi (2007), as reações antígeno-anticorpo são melhor estabilizadas a temperatura mais baixas, explicando o melhor desempenho dos dispositivos mantidos nessa condição.

5.4.2.2 Avaliação do biossensor em solução estabilizante formulada

O desempenho do biossensor estocado em solução estabilizante para anticorpos formulada no laboratório, em condição refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C), durante 120 dias está representado na Figura 13). A resposta binária foi determinada a partir de um ponto de corte de $-2,2 \mu\text{A}$ em leite UHT.

Figura 13 – Resposta amperométrica do biossensor em concentração conhecida de *S. Typhimurium* (10^6 UFC mL^{-1}) em leite UHT integral após estocagem em solução formulada durante 120 dias. O desvio padrão está apresentado para $n = 10$.



SFR, solução formulada refrigerada (4°C) e solução formulada ambiente (25 °C); tempos 15; 30; 60, 90 e 120 dias.

Fonte: Elaborada pelo autor

As respostas amperométricas dos biossensores mantidos sob temperatura ambiente e refrigerada diferiram significativamente durante os primeiros 60 dias de armazenamento.

Os biossensores estocados a temperatura ambiente em solução estabilizante formulada, tiveram valores de corrente amperométrica constante e próximas ao valor do ponto de corte, indicando assim, reduzida capacidade de detecção em relação aos dispositivos mantidos sob condição refrigerada. Alternativamente, os biossensores mantidos em solução estabilizante comercial sob condição refrigerada, apresentaram um excelente desempenho na detecção do patógeno pelo período de 60 dias. Aos 90 dias, houve perda da sensibilidade, não sendo detectada a presença do analito.

Um dos principais objetivos na formulação de uma solução de estocagem para biossensores é permitir o armazenamento dos dispositivos e fornecer um prazo de validade aceitável, que permita a detecção do patógeno pelo maior tempo possível. Formulações desta natureza, pelo nosso conhecimento, ainda não são comercialmente disponíveis. No entanto, para que haja o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo e conseqüentemente, a resposta do dispositivo seja obtida, procurou-se formular uma solução capaz de estabilizar as imunoglobulinas com adição de agentes auxiliares no controle da taxa de degradação destas moléculas e que não interferisse nas outras moléculas envolvidas na montagem do biossensor (tiol, proteína A, BSA, peroxidase) e também não causasse variação na resposta amperométrica. A solução formulada e proposta no presente estudo foi composta por meio tamponante, proteínas que auxiliam na estabilidade dos anticorpos, um agente conservante, que evita a contaminação microbiana e um quelante: PBS 1mM, BSA, 1mM, Azida de sódio 0,2%, EDTA 1mM.

O pH da solução formulada foi ajustado para 7,4 afim de mimetizar condição biológica ideal para homeostase de moléculas biológicas. Este pode ser um dos fatores que contribuíram para a performance dos dispositivos mantidos em solução formulada. Como outras proteínas, o efeito do pH na estabilidade dos anticorpos depende da composição da formulação, pois pode afetar a estabilidade física dos anticorpos, alterando o número e a distribuição de cargas na superfície da proteína. Dessa forma, pode ter um efeito potencial na estabilidade da formulação, uma vez que a agregação parece ser menor em pH neutro (DOMINGUEZ; HOLMES, 2011; WANG et al., 2007). Além disso, a escolha adequada de um agente tampão influencia na estabilização dos anticorpos. Valores extremos de pH também induzem alterações conformacionais nas moléculas de anticorpo o que provavelmente, dificulta a complementaridade com o antígeno.

A azida de sódio 0,2% é um agente conservante. Hendrix et al. (2019)

demonstraram que em baixa concentração do componente 0,015M (0,1% em peso) há um bom efeito inibidor e bacteriostático, não aumentando severamente o efeito iônico da solução. O EDTA, por sua vez, é um dos componentes utilizados como excipiente em formulações de anticorpos comerciais imunoconjugados (DUERR; FRIESS, 2019). De acordo com Mendonça et al. (2011) íons metálicos estabilizam proteases, considerando que o EDTA é um inibidor de metaloproteases e proteases ativadas por metais divalentes, ao adicioná-lo complexos hidrossolúveis podem ter sido formados, fazendo com que os íons fossem envolvidos por ligações covalentes ao agente quelante, prejudicando assim as proteases que por ventura estejam presentes na solução estabilizante (MENDONÇA et al., 2011). Dessa forma, a função de cada agente constituinte da formulação bem como a interação entre eles pode ter contribuído significativamente para o evidente desempenho dos dispositivos mantidos nesta condição em relação às demais.

5.4.2.3 Perda de resposta amperométrica dos biossensores

Uma avaliação da perda da resposta em percentual do biossensor mantido sob condição de estocagem por 120 dias foi realizada a partir da corrente inicial de dispositivos recém-preparados na presença de *S. Typhimurium* (10^6 UFC mL⁻¹) em leite UHT está descrito na Tabela 12. A perda de resposta amperométrica do biossensor foi calculada a partir da amplitude de corrente apresentada pelo biossensor recém-preparado na presença do patógeno.

Tabela 12 – Percentual de redução de corrente elétrica catódica dos dispositivos após estocagem em solução estabilizante formulada e comercial ao longo do tempo (15; 30; 60, 90 e 120 dias) em condição refrigerada (4 °C) e ambiente (25 °C).

Percentual de perda da corrente amperométrica (%)				
Tempo (dias)	SCR	SCA	SFR	SFA
0	0	0	0	0
15	11,3	26,4	4,48	53,93
30	15,05	72,9	5,00	58,5
60	69,4	89,2	11,87	62,71
90	86,5	93,46	69,81	63,93
120	91,44	91,6	77,85	63,18

*Solução Comercial Refrigerada (SCR); Solução Comercial Ambiente (SCA); Solução Formulada Refrigerada (SFR); Solução Formulada Ambiente (SFA).

Fonte: Elaborada pelo autor

Aos 15 dias de armazenamento, os biossensores mantidos a temperatura ambiente (25 °C) para as duas soluções estabilizantes testadas, exibiram redução da resposta de 26,4% para solução comercial e 53,93% para solução formulada e ainda foram capazes de detectar positivamente o patógeno. No entanto, após este período, houve acentuado declínio na resposta dos biossensores mantidos em solução comercial (72,9%). Na solução formulada, como comentado anteriormente, a variação de corrente se manteve próxima ao ponto de corrente e a perda de resposta se manteve constante ao longo do tempo.

Em condição refrigerada (4 °C), os dispositivos apresentaram excelente desempenho na detecção do patógeno e mantiveram a menor perda do sinal ao longo do tempo, para ambas soluções, comercial e formulada. O armazenamento em condição refrigerada apresentou perda de 11,3% da resposta original para solução comercial e apenas 4,48% para solução formulada, durante o período de 15 dias. Aos 30 dias, a perda de resposta dos dispositivos mantidos em solução comercial refrigerada foi de 15,05%. A partir de 60 dias, as respostas decaíram consideravelmente, apresentando 69,4% de perda, período em que os dispositivos perderam capacidade de detectar o patógeno. Em contrapartida, para os biossensores estocados em solução estabilizante formulada refrigerada, a resposta foi mantida em 95,0%, apenas 5,0 % de perda por 30 dias, 11,87% por 60 dias e 69,81% por 90 dias, quando os dispositivos pararam de detectar a presença da *Salmonella* no leite.

Em solução comercial e temperatura refrigerada, os dispositivos tiveram respostas positivas com precisão por até 60 dias, quando houve perda de 69,4% de sua resposta inicial. Estocados em solução formulada, seu desempenho foi mantido por 90 dias, com 69,81% de perda de sua resposta de início. Embora, o biossensor tenha apresentado boa estabilidade na condição refrigerada (4 °C) para as duas soluções, sua performance foi máxima e estável por maior período de tempo quando estocados em solução formulada. Sendo assim, esta foi a melhor condição encontrada para o armazenamento do biossensor.

6 CONCLUSÕES

- O biossensor apresentou excelente probabilidade de detecção, sendo capaz de detectar a presença de *Salmonella* sp. em uma das menores concentrações do patógeno em comparação com outros imunossensores. O biossensor foi eficiente, sensível e específico na detecção do patógeno para os dois tipos de leite avaliados, sem requerer etapa de pré-enriquecimento para a concentração de *Salmonella* de 10 UFC. mL⁻¹.
- O componente gordura do leite reduziu a performance do dispositivo. Porém, o processo de centrifugação demonstrou ser eficiente para retirada dos maiores glóbulos de gordura e não alterou a concentração de bactérias.
- Os biossensores apresentaram sensibilidade e estabilidade após estocagem em solução estabilizante formulada mantida sob refrigeração, sendo a melhor condição para o armazenamento dos dispositivos.
- Os resultados mostraram que a solução formulada refrigerada manteve o desempenho do biossensor por 90 dias e aos 120 dias não mais detectou o patógeno, indicando que o prazo de validade deva ser estabelecido dentro deste período.

REFERÊNCIAS

- ADELOJU, S. B.; MOLINE, A. N. Fabrication of ultra-thin polypyrrole-glucose oxidase film from supporting electrolyte-free monomer solution for potentiometric biosensing of glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 3, p. 133–139, 2001
- ALEXANDRE, D. L. et al. A Rapid and Specific Biosensor for Salmonella Typhimurium Detection in Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 4, p. 748–756, 2018.
- ALIKHAN, N. F. et al. A genomic overview of the population structure of Salmonella. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 4, p. 1–13, 2018.
- ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. S. Salmonella. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)** on line. FDA 2018. Chap. 5. Disponível em:
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> .
 Acesso em: 25 out. 2018.
- AOAC. AOAC® PRE-PUBLICATION DRAFT AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces EFFECTIVE DATE FOR USE: FEBRUARY 24, 2012 AOAC® Guidelines for Validation of Microbiological Methods. **Consensus by AOAC Methods Committee on Microbiology on Sept**, v. 18, n. 12, p. 1–46, 2012.
- APHA. **Salmonella**. [s.l: s.n.]. Disponível em:
 <<https://www.food.gov.uk/print/pdf/node/274>>. Acesso em: 17 dez. 2018.
- AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. **Immunochemistry**, v. 6, n. 1, p. 43-49, 1969.
- BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P.; MACHADO, T. F. Salmonelose associada ao consumo de leite e produtos lácteos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010.
- BRANDÃO, D.; LIÉBANA, S.; PIVIDORI, M. I. Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles. **New Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 511–520, 25 set. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Salmonella spp. Diagnóstico Laboratorial do Gênero Salmonella**. 1ª edição ed. Brasília – DF: [60].
- BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9cbab600417aa4088799e722d1e56fc9/anexos_res0012_02_01_2001.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 7 mai. 2019
- BRUNELLE, S. Validation of microbiological methods for food. In: **Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods: Third Edition**. Woodinville: Elsevier Inc., 2016. p. 267–294.

CDC. **Raw (Unpasteurized) Milk | Features | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/features/rawmilk/>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

CENTER OF DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Salmonella**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

COELHO, L. R. **Equivalência de Métodos Alternativos ao Oficial Para Determinação De Salmonella Enteritidis e Typhimurium em Amostras Ambientais Avícolas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2012.

CORTINHAS, C. S. **Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras**. p. 125, 2013. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

DOMINGUEZ, R.; HOLMES, K. C. **Antibody structure and function**. Focus, v. 40, n. 1, p. 58–78, 2011.

DUERR, C.; FRIESS, W. Antibody-drug conjugates-stability and formulation. 2019.

EUZÉBY, J. P. Revised Salmonella nomenclature: designation of Salmonella enterica (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus Salmonella Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name Sal. **International journal of systematic bacteriology**, v. 49 Pt 2, n. 1 999, p. 927–30, 1 abr. 1999.

EFSA. Multi-country outbreak of Salmonella Agona infections possibly linked to ready-to-eat food. **EFSA Supporting Publications**, v. 15, n. 7, 2018.

FDA. **Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds, 2 nd Ed.**

ACKNOWLEDGMENT. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM298730.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2018.

FEI, J.F., DOU, W.C., ZHAO, G.Y. Amperometric immunoassay for the detection of Salmonella pullorum using a screen - printed carbon electrode modified with gold nanoparticle-coated reduced graphene oxide and immunomagnetic beads. **Microchimica Acta**, v. 183 (2), p. 757–764, 2016.

FELDSINE, P.; ABEYTA, C.; ANDREWS, W. H. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 5, p. 1187–1200, 2002.

FENG, P., 2001. **Bacteriological Analytical Manual: Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens**. 8th Edition ed.

FREITAS, M., VISWANATHAN, S., NOUWS, H.P.A., OLIVEIRA, M.B.P.P., DELERUE-

MATOS, C. Iron oxide/gold core/shell nanomagnetic probes and CdS biolabels for amplified electrochemical immunosensing of *Salmonella typhimurium*. **Biosens. Bioelectron.** 51, 195–200, 2014.

FULGIONE, A. et al. QCM-based immunosensor for rapid detection of *Salmonella Typhimurium* in food. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

FURTADO, R. et al. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Documentos 117. 2008.

GONDIM, C. DE S. et al. Determining performance parameters in qualitative multivariate methods using probability of detection (POD) curves. Case study: Two common milk adulterants. **Talanta**, v. 168, n. September 2016, p. 23–30, 2017.

HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Second Edition. 2012. 264 p. 2012. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2018

HENDRIX, K. et al. Sodium azide used as microbial inhibitor caused unwanted by-products in anaerobic geochemical studies. **Applied Geochemistry**, v. 107, p. 120–130, 1 ago. 2019.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos - doq-cgcre-008. 2018.

KUSHIDA, M. M. **Validação de métodos laboratoriais: avaliação do sistemaBax® de análise de *Salmonella sp.* em alimentos por reação de polimerase em cadeia (PCR)**. p. 166, 2005. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2013

KUTTER, S.; HARTMANN, A.; SCHMID, M. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria spp.* **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, n. 2, p. 262–271, 1 maio 2006.

LABUDDE, R. A.; HARNLY, J. M. Probability of identification: A statistical model for the validation of qualitative botanical identification methods. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 1, p. 273–285, 2012.

LEE, K.-M. et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264–276, 2015.

MELO, A. M. A. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de *Salmonella sp.* em leite**. v. 1, n. 1, p. 85 f., 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

MELO, A. M. A. et al. Electrochemical immunosensors for *Salmonella* detection in food. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5301–5312, 2016.

MELO, A. M. A. et al. Optimization and characterization of a biosensor assembly for detection of *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 5,

p. 1321–1330, 2018.

MENDONÇA, E. G. DE et al. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia Gemmatalis*. **HÜBNER**, v. 1818, p. 446–454, 2011.

MUNGAI, E. A.; BEHRAVESH, C. B.; GOULD, L. H. Increased Outbreaks Associated with Nonpasteurized Milk, United States, 2007–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 119–122, jan. 2015.

PILAS, J. et al. Application of a portable multi-analyte biosensor for organic acid determination in silage. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 5, p. 1–12, 2018.

PIMENTA-MARTINS, M. G. R. et al. Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 1, p. 138–143, out. 2012.

POLACZYK, A. L. et al. Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, n. 2, p. 92–99, 1 maio 2008.

PULIDO, A. et al. Estimating the uncertainty of binary test results to assess their compliance with regulatory limits. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, n. 2, p. 267–275, 2002.

QUAN, G. et al. Fimbriae and related receptors for *Salmonella Enteritidis*. **Microbial Pathogenesis**, 19 out. 2018.

REVERBERI, R.; REVERBERI, L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. **Blood Transfusion**, v. 5, n. 4, p. 227–240, 2007.

ROHDE, A. et al. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 113–118, 1 abr. 2017.

RON, E.; FREEMAN, A.; SOLOMON, B. Stabilization and surface modification of monoclonal antibodies by ‘bi-layer engagement’. **Journal of Immunological Methods**, v. 180, n. 2, p. 237–245, 1 jan. 1995.

SHEIKHZADEH, E., CHAMSAZ, M., TURNER, A.P.F., JAGER, E.W.H., BENI, V. Label-free impedimetric biosensor for *Salmonella Typhimurium* detection based on poly [pyrrole-co-3-carboxyl-pyrrole] copolymer supported aptamer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 194–200, 2016.

SILVA, N.F.D., MAGALHAES, J.M.C.S., OLIVA-TELES, M.T., DELERUE-MATOS, C. A potentiometric magnetic immunoassay for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. **Anal. Methods**, v. 7 (9), p. 4008–4011, 2015.

SILVA, N. F. D. et al. Electrochemical biosensors for *Salmonella*: State of the art and challenges in food safety assessment. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, n. August 2017, p. 667–682, 2018.

SNOW, M. Preventing salmonella infection. **Nursing**, v. 36, n. 9, p. 17, 2006.

UE. REGULAMENTO (CE) N.º 1441/2007 DA COMISSÃO de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológico. n. 7, p. 12–29, 2007.

VELUSAMY, V. et al. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 232-254, 2010.

VALDERRAMA, W.B., DUDLEY, E.G., DOORES, S., CUTTER, C.N., **Commercially Available Rapid Methods for Detection of Selected Food-borne Pathogens**, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56:9, 1519-1531, 2016. DOI: 10.1080/10408398.2013.7755672016

WANG, W. et al. Antibody structure, instability, and formulation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 1, p. 1–26, 2007.

WANG, D.H., WANG, Z.Y., CHEN, J.H., KINCHLA, A.J., NUGEN, S.R. Rapid detection of Salmonella using a redox cycling-based electrochemical method. **Food Control**, v. 62, p. 81–88, 2016.

WILSON, D. et al. Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides. **Talanta**, v. 194, p. 611–618, 1 mar. 2019.

WHO | Salmonella. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/>. Acesso em: 3 dez. 2018.

XIANG, C.L., LI, R., ADHIKARI, B., SHE, Z., LI, Y.X., KRAATZ, H.B. Sensitive electrochemical detection of Salmonella with chitosan-gold nanoparticles composite film. **Talanta**, v. 140, p. 122–127, 2015.

XU, M., WANG, R., LI, Y. Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium in foods using an electrochemical immunosensor based on screen-printed interdigitated microelectrode and immunomagnetic separation. **Talanta**, v. 148, p. 200–208, 2016.

ZHANG, Z. et al. Rapid and sensitive detection of Salmonella typhimurium based on the photothermal effect of magnetic nanomaterials. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 268, p. 188–194, 2018.

ANEXO A – CÁLCULO DA POD

AOAC® Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces

APPENDIX X-C. Calculation of POD and dPOD Values from Qualitative Method Single Laboratory Data

In general, four different probabilities detected (PODs) are to be calculated: POD_R (for the reference method), POD_C (for the confirmed candidate method), POD_{CP} (for the candidate presumptive method) and POD_{CC} (for the candidate confirmation method).

For each of these four cases, calculate the POD as the ratio of the number positive (x) to total number tested (N):

$$POD = \frac{x}{N}, \quad \text{Where POD is } POD_C, POD_R, \text{ etc.}$$

The POD estimates and 95% confidence interval (LCL, UCL) estimates are given by:

1. For the case where $x = 0$,

$$POD = 0$$

$$LCL = 0$$

$$UCL = 3.8415 / (N + 3.8415)$$

2. For the case where $x = N$,

$$POD = 1$$

$$LCL = N / (N + 3.8415)$$

$$UCL = 1$$

3. For the case where $0 < x < N$,

$$POD = \frac{x}{N}$$

$$LCL = \frac{x + 1.9207 - 1.9600 \sqrt{x - \frac{x^2}{N} + 0.9604}}{N + 3.8415}$$

$$UCL = \frac{x + 1.9207 + 1.9600 \sqrt{x - \frac{x^2}{N} + 0.9604}}{N + 3.8415}$$

where $1.9600 = z$, the Gaussian quantile for probability 0.975, $1.9207 = z^2 / 2$, $0.9604 = z^2 / 4$ and $3.8415 = z^2$.

Finally, if $x \leq 1$, set $LCL = 0$. If $x \geq N-1$, set $UCL = 1$.

The confidence interval corresponds to the uncorrected Wilson-score method, modified for $x = 1$ and $x = N-1$ to improve coverage accuracy on the boundary.

Consensus by AOAC Methods Committee on Microbiology on Sept. 18, 2011.

Approved by AOAC Official Methods Board on Sept. 22, 2011.

Presented to the AOAC INTERNATIONAL Board of Directors on Dec. 12, 2011

18-Jan-12 (AOAC® Validation Guidelines for Food Microbiology 2011– Pre-publication Draft)

AOAC Standards Development
©2012 AOAC INTERNATIONAL

Fonte: (AOAC 2012, p. 32).

ANEXO B – CÁLCULO DA DPOD

AOAC® Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces

dPOD for Unpaired Studies

The differences in proportions detected are estimated by:

$$\begin{aligned}d\text{POD}_C &= \text{POD}_C - \text{POD}_R \\d\text{POD}_{CP} &= \text{POD}_{CP} - \text{POD}_{CC}\end{aligned}$$

If the replicates tested by the candidate and reference methods are unpaired (i.e., the enrichment conditions differ between the methods, thus the methods require analysis of distinct test portions), the associated 95% confidence interval (LCL, UCL) for the expected value of $d\text{POD} = \text{POD}_1 - \text{POD}_2$ is estimated by:

$$\begin{aligned}\text{LCL} &= d\text{POD} - \frac{\sqrt{(\text{POD}_1 - \text{LCL}_1)^2 + (\text{POD}_2 - \text{UCL}_2)^2}}{\sqrt{\quad}} \\ \text{UCL} &= d\text{POD} + \frac{\sqrt{(\text{POD}_1 - \text{UCL}_1)^2 + (\text{POD}_2 - \text{LCL}_2)^2}}{\sqrt{\quad}}\end{aligned}$$

where $(\text{LCL}_1, \text{UCL}_1)$ is a 95% confidence interval for POD_1 and $(\text{LCL}_2, \text{UCL}_2)$ is a 95% confidence interval for POD_2 , as determined above.

dPOD for Paired Studies

If the replicates tested by the candidate and reference methods are paired (i.e., the enrichment conditions are the same, thus common test portions are analyzed by both methods), the associated 95% confidence interval (LCL, UCL) for the expected value of $d\text{POD} = \text{POD}_1 - \text{POD}_2$ is estimated by the following:

Let

$$d_i = x_{1i} - x_{2i}$$

denote the numerical difference of the two method results on test portion i . Note that d_i must take on only the values $-1, 0$ or $+1$.

The recommended method for estimating dPOD is the mean of differences d_i :

$$d\text{POD} = \frac{\sum_{i=1}^N d_i}{N}$$

where N is the number of test portions.

The recommended approximate 95% confidence interval is the usual Student-t based interval, with the standard error of dPOD computed in the usual manner from the replicate differences:

Consensus by AOAC Methods Committee on Microbiology on Sept. 18, 2011.
Approved by AOAC Official Methods Board on Sept. 22, 2011.
Presented to the AOAC INTERNATIONAL Board of Directors on Dec. 12, 2011
18-Jan-12 (AOAC® Validation Guidelines for Food Microbiology 2011– Pre-publication Draft)

AOAC Standards Development
©2012 AOAC INTERNATIONAL