

BIOSENSORES MICROFLUIDICOS APLICADOS NA DETECÇÃO DE MASTITE EM GADOS LEITEIROS

A. C. Soares^{1,*}, J. C. Soares¹, V. C. Rodrigues², H.M. Brandão³, O. N. Oliveira Jr², L. H. C. Mattoso¹

¹ Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP

² Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), Av. Trabalhador São-carlense, 400, 13566-590, São Carlos, SP

³ Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, 36038-330, Juiz de Fora, MG

* Autor correspondente, e-mail: andreycoatrini@gmail.com

Resumo: A necessidade de diagnósticos rápidos para detecção de doenças veterinárias motivou pesquisadores a desenvolver biossensores seletivos de baixo custo. Uma dessas doenças é a mastite, que leva a perdas consideráveis devido à produção reduzida de leite e possíveis mortes. Neste trabalho, biossensores microfluidicos foram fabricados com filmes poliméricos com diferentes números de bicamadas. Essas arquiteturas foram funcionalizadas com camada ativa para detecção de bactérias em amostras comerciais e de leite, usando espectroscopia de impedância elétrica. Os limites de detecção foram suficientes para detecção de rastros de bactérias e modelada pela isoterma de Langmuir-Freundlich. Técnicas de visualização de informações foram usadas para verificar a seletividade dos biossensores. Com o IDMAP, foi obtida maior distinção entre amostras comerciais e leite contendo bactérias com o filme LbL de maior número de bicamadas. O mecanismo de detecção foi elucidado usando espectroscopia PM-IRRAS, monitorando as bandas de amida I e II, respectivamente. Esses biossensores de baixo custo foram eficazes no diagnóstico e prognóstico da mastite e podem ser implementados na pecuária com transferência de tecnologia

Palavras-chave: biossensor, técnicas microfluídicas, mastite bovina

MICROFLUIDIC BIOSENSORS APPLIED IN MASTITIS DETECTION IN DAIRY CATTLES

Abstract: The need for rapid diagnosis of veterinary diseases has motivated research to develop low cost, selective biosensors. One of such diseases is Mastitis that leads to considerable losses owing to reduced milk production and possible animal deaths. In this work, we developed microfluidic biosensors made with LbL films with different numbers of bilayers. These molecular architectures were functionalized with active layer to detect bacterial colonies in milk and commercial samples using electrical impedance spectroscopy. The limits of detection were sufficient for detection of bacterial traces and modeled by the Langmuir-Freundlich isotherm. Information visualization techniques were used to analyze the spectra and verify the selectivity of biosensors. With IDMAP technique, higher distinction of commercial samples and milk with bacterias was obtained with the most bilayer number LbL film. The detection mechanism was elucidated using Polarization Modulated-Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS) by monitoring the amide I and II bands, respectively. These low-cost biosensors are effective for mastitis diagnostics and prognostics in cattle, which may be further implemented in agriculture with technology transfer

Keywords: biosensor, microfluidic techniques, mastitis

1. Introdução

A necessidade de diagnósticos para detecção de doenças veterinárias com alto risco de transmissão tem motivado pesquisas em nanotecnologia e instrumentação agropecuária para

desenvolver biossensores altamente seletivos, de baixo custo e que detecte a doença rapidamente. Neste cenário, o rápido diagnóstico da mastite é a única possibilidade de aumentar as chances de cura do animal e diminuir prejuízos econômicos ao produtor relativos às alterações fisiológicas do rebanho e alteração da qualidade do leite, que pode levar o ser humano ao adoecimento físico através de graves infecções.

Um dos diagnósticos mais versáteis para detecção da Mastite, mas que carecem de aperfeiçoamento e qualidade são os biossensores eletroquímicos e elétricos, construídos a partir de filmes nanoestruturados poliméricos (ARIGA et al., 2019). São dispositivos miniaturizados que funcionam com base na detecção de interações específicas, no qual um elemento de reconhecimento biológico interage de modo seletivo em um meio complexo com a substância de interesse e um transdutor converte a resposta em um sinal mensurável (MOUSA, 2010). Os biossensores apresentam várias vantagens em relação aos métodos convencionais de sensoriamento (cromatografia e bioquímicos), tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) e o teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay), dentre elas o menor tempo de análise, fácil manuseio, menor custo, possibilidade de miniaturização, podendo ser portáteis e usados em análise em tempo real, podendo auxiliar na rápida detecção de doenças. Neste trabalho, biossensores de afinidade foram desenvolvidos a partir de filmes nanoestruturados poliméricos para detecção de rastros de bactérias presentes em amostras de leite originárias de gados infectados por Mastite.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação dos Filmes Nanoestruturados

Filmes nanoestruturados foram preparados sobre eletrodos microfluídicos empregando a técnica de automontagem. Primeiramente, a solução de um polícatión foi injetada no microcanal do eletrodo, utilizando bombas de seringa com fluxo constante, seguido da imobilização do poliânion, usando as mesmas condições anteriores. Ambas as etapas são precedidas da lavagem para remoção de camadas fracamente adsorvidas. Após esta etapa, a camada ativa é imobilizada e os sítios ativos não específicos são bloqueados por uma solução de albumina de soro bovino (BSA) (SOARES et al., 2015a, 2015b).

2.2. Detecção de Mastite

A detecção de mastite foi realizada por medidas de espectroscopia de impedância elétrica. Após a imobilização da camada ativa, soluções aquosas de bactérias, com diferentes concentrações foram injetadas nos eletrodos como controle positivo, seguido de lavagem com água ultrapura para remoção de moléculas não adsorvidas. O mesmo procedimento foi utilizado para avaliar o controle de qualidade do leite, no qual amostras de leite com diferentes concentrações de bactérias e experimentos de controle com diferentes interferentes foram adsorvidos no eletrodo de trabalho para avaliar a eficiência do biossensor. Os espectros de capacitância foram utilizados para construir as curvas de calibração, analisar os parâmetros analíticos dos biossensores (limite de detecção) e desenvolver mapas de visualização que avaliam a seletividade do biossensor.

3. Resultados e Discussão

A espectroscopia de impedância elétrica foi realizada para detectar bactérias devido à forte interação específica entre a mesma e a camada ativa. Alterações elétricas foram melhor observadas em frequências abaixo de 1000 Hz, nas quais as alterações na dupla camada elétrica são induzidas pela interação camada ativa-bactéria. Essa interação altera as medidas elétricas, das quais são usadas na construção das curvas de calibração, mostrando que o número de sítios ativos disponíveis para adsorção das bactérias tende a zero com a concentração, porque sua interação com a camada ativa é irreversível. Os biossensores apresentaram LoD suficientes para detecção de rastros de bactérias em amostras de leite, uma vez que o valor é inferior à outros biossensores similares (WILSON et al., 2019). Dispositivos como estes detectam interações químicas entre a camada ativa

e as bactérias a partir de transdução do sinal. Essas interações geram excelente desempenho dos biossensores, porém é necessário elucidar o mecanismo de bioreconhecimento entre camada ativa e bactérias. Medidas de PM-IRRAS indicam que o mecanismo de detecção é governado por interações específicas que ocorrem nas regiões de amida I e II, sem haver mudança na orientação molecular dos dipolos.

A otimização do desempenho é fundamental para escolha das melhores condições de fabricação dos biossensores. Para isso, projeções multidimensionais a partir da técnica IDMAP foram usadas para avaliar a seletividade e comparar o desempenho dos dispositivos. Biossensores número maior de bicamadas possui melhor seletividade e distinção entre diferentes concentrações de bactérias. Tal seletividade pode ser quantificada pelo coeficiente de Silhueta (S), no qual $S \sim 1$ indica que o sistema faz excelente distinção das amostras, $S \sim 0$ e $S \sim -1$ indicam que o sistema é ineficiente na distinção das amostras. Para os biossensores, os coeficientes de silhueta foram próximos a 1, corroborando a eficiência dos sensores nas distinções de amostras de bactérias.

4. Conclusões

Filmes nanoestruturados poliméricos foram usados no desenvolvimento de biossensores para análise da qualidade do leite a partir da detecção de mastite bovina. A otimização do filme mostrou-se adequada, pois permitiu a escolha da melhor arquitetura para imobilização da camada ativa. Na detecção não foram observados falsos positivos quando o biossensor foi exposto à diferentes concentrações de bactérias. Além disso, a sensibilidade é suficiente para aplicações em análises veterinárias, sendo superior à maioria dos biossensores disponíveis para este fim. Outras contribuições importantes estão relacionadas ao uso de métodos de visualização de informações para comparar o desempenho de sensores e biossensores e a identificação do mecanismo de nível molecular responsável pela detecção. Com relação à comparação de unidades sensoriais, mapas de visualização de informações forneceram uma quantificação da seletividade das unidades sensoriais. Além disto verificou-se que o mecanismo de detecção está associado à interação específica entre camada ativa e bactéria, sendo comprovado por medidas de PM-IRRAS.

Agradecimentos

Este trabalho é financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2018/18953-8), CNPq (Processo nº 402287/2013), SISNANO/MCTI e Rede AgroNano. Os autores são gratos ao Grupo de Polímeros Bernhard Gross (IFSC-USP) e aos pesquisadores do CNPEM Maria Helena Piazzetta e Angelo Gobbi pelo auxílio na confecção dos eletrodos.

Referências

- ARIGA, K. et al. Layer-by-Layer Assembly: Recent Progress from Layered Assemblies to Layered Nanoarchitectonics. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 14, n. 15, p. 2553–2566, ago. 2019.
- MOUSA, S. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnology, Science and Applications**, p. 1, dez. 2010.
- SOARES, A. C. et al. Controlled Film Architectures to Detect a Biomarker for Pancreatic Cancer Using Impedance Spectroscopy. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 46, p. 25930–25937, 25 nov. 2015a.
- SOARES, A. C. et al. A simple architecture with self-assembled monolayers to build immunosensors for detecting the pancreatic cancer biomarker CA19-9. **The Analyst**, v. 143, n. 14, p. 3302–3308, 2018.
- SOARES, J. C. et al. Supramolecular Control in Nanostructured Film Architectures for Detecting Breast Cancer. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 22, p. 11833–11841, 10 jun. 2015b.
- 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, mar. 2019.