

**BIOSENSORES POLIMÉRICOS NANOESTRUTURADOS APLICADOS PARA
DIAGNÓSTICO DE MASTITE**

J. C. Soares¹, A. 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, Av. Eugênio do Nascimento, 610 - Aeroporto, Juiz de Fora – MG*

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

Resumo: Biossensores para se detectar doenças relacionadas ao gado, é o principal foco deste trabalho. O intuito é o diagnóstico da Mastite para se determinar qual o antibiótico mais adequado a ser ministrado em curto espaço de tempo, evitando assim uma contaminação cruzada entre o rebanho. Esse biossensor é construído a partir de um filme polimérico, funcionalizado com proteínas. A superfície dos biossensores foi caracterizada a fim de se comprovar a modificação do eletrodo. Por meio de medidas elétricas, a mastite foi detectada com uma alta sensibilidade. Seguindo da detecção, análises sobre a seletividade dos biossensores foram realizadas por meio de mapas de visualização de informações e análises estatísticas, o que permitiu otimizar as melhores condições e parâmetros das unidades sensoriais. A combinação dos resultados da caracterização e da detecção, permitiu identificar propriedades dos dispositivos, visando tanto a otimização do seu desempenho, quanto a sensibilidade e seletividade para a aplicação em rebanhos, com o intuito de se facilitar diagnósticos em um curto espaço de tempo, aumentando a sobrevivência do rebanho.

Palavras-chave: Filme nanoestruturado, mastite, biossensor.

NANOSTRUCTURED POLYMERIC BIOSENSORS APPLIED FOR MASTITIS DIAGNOSIS

Abstract: Biosensors to detect cattle-related diseases is the main focus of this work. The purpose is to diagnose mastitis to determine which antibiotic is most appropriate to be given in a short time, thus avoiding cross contamination between the cattle. This biosensor is constructed from a protein-functionalized polymeric film. The biosensors surface was characterized in order to prove the electrode modification and through electrical techniques, mastitis was detected with a high sensitivity. Following detection, biosensor selectivity analyzes were performed by means of information visualization maps and statistical analyzes, which allowed optimizing the best conditions and parameters of the sensory units. The combination of characterization and detection results allowed the identification of device properties, aiming at optimizing their performance as well as sensitivity and selectivity for application in cattle, in order to facilitate diagnosis in a short time, increasing the survival.

Keywords: Nanostructured film, mastitis, biosensor

1. Introdução

A presença de certas bactérias é uma das principais causas de mastite subclínica em bovinos leiteiros e também uma fonte de prejuízo econômico para a indústria, devido ao aumento do número de infecções causadas por certas cepas bacterianas resistentes a múltiplos fármacos. Para isso, surge-se então o uso de técnicas de detecção rápidas para serem aplicadas a essa bactéria, e, posteriormente, em áreas clínicas (JAMALI et al., 2018; CÔTÉ-GRAVEL et al., 2019).

A Mastite em bovinos provoca uma inflamação nas glândulas mamárias devido a presença de microorganismos hospedeiros que vivem dentro da glândula³, que em sua forma subclínica, pode

ser persistente e, quando isso ocorre, uma grande quantidade de bactérias podem estar presentes no leite e serem fontes de infecções para outros rebanhos. Assim, há muitas perdas economicamente devido aos altos custos do tratamento, morte e diminuição da produção de leite e, ainda, a ocorrência do uso descontrolado de antibióticos para combatê-la, o que pode causar um aumento de estirpes de bactérias resistentes que podem entrar na cadeia alimentar (ADKINS et al., 2018).

Neste cenário, a aplicação de biossensores de baixo custo e de rápido diagnóstico fabricados a partir de nanocompósitos, juntamente com moléculas de proteínas, podem melhorar a sensibilidade e a seletividade do diagnóstico de Mastite, que é o objetivo deste trabalho. Além de técnicas convencionais de detecção, análises sobre a seletividade dos biossensores são realizadas por meio de mapas de visualização de informações e análises estatísticas, o que permite otimizar as melhores condições e parâmetros das unidades sensoriais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação dos Filmes Nanoestruturados

Os filmes nanoestruturados foram preparados sobre esses eletrodos interdigitados, empregando automontagem por adsorção química (SAM). Nestes tipos de filmes, eletrodos interdigitados foram imersos em soluções de quitosana durante 10 minutos, seguido da lavagem e secagem em temperatura ambiente, formando um filme fino estável que serviu de suporte para imobilização das camadas ativas para detecção de bactérias.

2.2. Detecção de Mastite a partir de moléculas de biomarcadores da bactéria *S. aureus*

Medidas elétricas foram realizadas para detectar amostras da bactéria *S. aureus*. Foram usados eletrodos interdigitados, funcionalizados por anticorpos Anti *S. aureus*, durante 30 min. Na próxima etapa, as bactérias foram adsorvidas em diferentes concentrações, para a construção das curvas de calibração a partir de dados de adquiridos durante as medidas elétricas.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização de filmes baseados no diagnóstico de mastite por PM-IRRAS

Os espectros de PM-IRRAS dos filmes contendo quitosana/ Anti- *S. aureus* adsorvidos em eletrodos interdigitados de ouro são apresentados na Figura 1. O espectro exibe as principais características de bandas de proteínas e aquelas relacionadas às bactérias. As principais bandas características presentes tiveram sua intensidade aumentada com a presença de bactérias. Isso prova a modificação do filme, durante as etapas de adsorção.

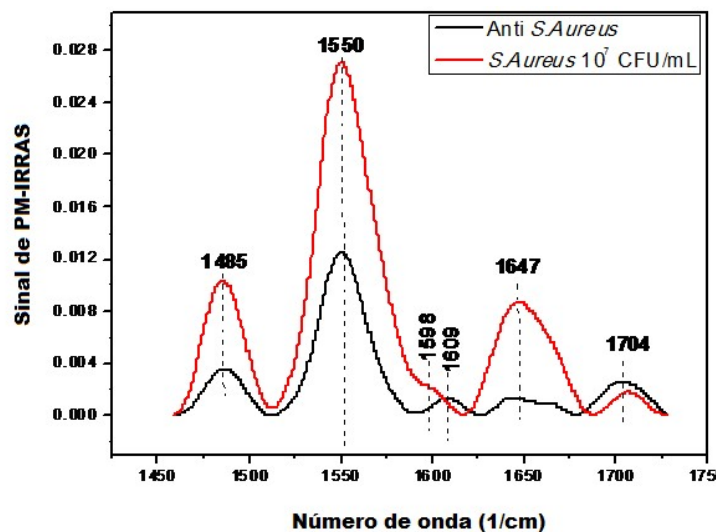


Figura 1. Espectros de PM-IRRAS para o filme de Chi / Anti-*S. aureus* e, em seguida, após exposição às amostras de *S. aureus* comercial.

3.2. Detecção Eletroquímica de *S. aureus* em amostras comerciais

Os dados de impedância eletroquímica indicam considerável dependência com a amostra contendo *S. aureus*. Houve uma variação da impedância, com a concentração de *S. aureus*. O limite de detecção foi estimado em 1UFC/mL, a partir do método da IUPAC ($LOD = 3SB / S$), onde SB é o desvio padrão de 10 medidas tomadas a partir do sinal obtido do branco e S é o declive da curva de calibração.

3.3. Resultados estatísticos baseados no método PEX Sensor

Foram analisados cada espectro resultantes das detecções baseadas em impedância eletroquímica, originando o IDMAP. O IDMAP é representado como um ponto no gráfico 2D projetado. Amostras da mesma natureza se apresentam com uma distância pequena umas das outras e as que se diferem, se apresentam distantes. A Figura 2 mostra o gráfico de IDMAP baseado nos espectros de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica durante as detecções. As amostras contendo *S. aureus* foram distinguidas, cujos pontos de dados são deslocados para a direita com o aumento da concentração, corroborando com os resultados de impedância.

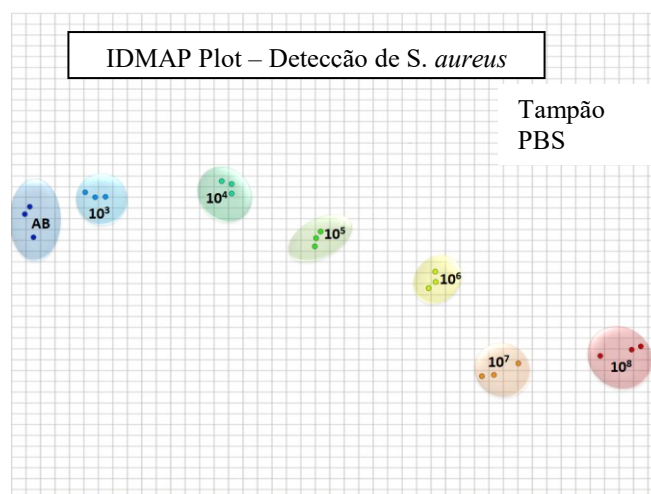


Figure 2. Gráfico de IDMAP a partir dos espectros impedância eletroquímica obtidos a partir de amostras de *S. aureus* comercial.

4. Conclusões

Partindo do objetivo inicial de que para combater a disseminação de infecções provocadas por bactérias resistentes, como a *S.aureus*, e ainda minimizar o desperdício de recursos públicos em tratamentos dispendiosos devido a demora em se iniciar um tratamento com antibióticos, novas estratégias para o desenvolvimento de um biossensor para diagnósticos para a detecção de *S. aureus* foram desenvolvidas neste trabalho. O diagnóstico foi feito em curto espaço de tempo, com alta especificidade e sensibilidade para detecção de colônias de *Staphylococcus aureus* em amostras comerciais, com um baixo limite de detecção.

Agradecimentos

Este trabalho é financiado pelo CNPq (Processo nº 402287/2013 e 113757/2018-2), 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

- (1) Jamali, H.; Barkema, H. W.; Jacques, M.; Lavallée-Bourget, E.-M.; Malouin, F.; Saini, V.; Stryhn, H.; Dufour, S. Invited Review: Incidence, Risk Factors, and Effects of Clinical Mastitis

Recurrence in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* , v.101 . n. 6, p.4729–4746, 2018.

- (2) Côté-Gravel, J.; Malouin, F. Symposium Review: Features of *Staphylococcus Aureus* Mastitis Pathogenesis That Guide Vaccine Development Strategies. *Journal of Dairy Science*, v. 102 , n. 5, p. 4727–4740, 2019.
- (3) Adkins, P. R. F.; Middleton, J. R. Methods for Diagnosing Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.34 , n. 3, p.479–491,2018.