

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO

### ANAIS DO VI WORKSHOP – 2012

Maria Alice Martins  
Morsyleide de Freitas Rosa  
Men de Sá Moreira de Souza Filho  
Nicodemus Moreira dos Santos Junior  
Odílio Benedito Garrido de Assis  
Caue Ribeiro  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

#### Editores

Fortaleza, CE  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação**  
Rua XV de Novembro, 1452,  
CEP 13560-970 – São Carlos, SP  
Fone: (16) 2107-2800  
Fax: (16) 2107-2902  
<http://www.cnpdia.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpdia.embrapa.br](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270,  
CEP 60511-110 – Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
<http://www.cnpat.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpat.embrapa.br](mailto:sac@cnpat.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Embrapa Instrumentação**

Presidente: João de Mendonça Naime  
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira Milori, Washington Luiz de Barros Melo, Sandra Protter Gouvêa, Valéria de Fátima Cardoso.  
Membro suplente: Paulo Sérgio de Paula Herrmann Júnior

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior  
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama  
Membros: Diva Correia, Marlon Vagner Valentim Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley Herbster Moura

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto  
Capa: Mônica Ferreira Laurito, Pedro Hernandes Campaner

Imagens da capa:

Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus Loures Mourão, Viviane Soares

Imagem de MEV de Eletrodeposição de cobre – Luiza Maria da Silva Nunes, Viviane Soares

Imagem de MEV de Colmo do sorgo – Fabrício Heitor Martelli, Bianca Lovezutti Gomes, Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de HPMC com nanopartícula de quitosana – Marcos Vinicius Lorevice, Márcia Regina de Moura Aouada, Viviane Soares

Imagem de MEV-FEG de Vanadato de sódio – Waldir Avansi Junior

Imagem de MEV de Fibra de pupunha – Maria Alice Martins, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2012): tiragem 300

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº. 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Instrumentação

---

Anais do VI Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio 2012 – São Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

Irregular

ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Rosa, Morsyleide de Freitas. III. Souza Filho, Men de Sá Moreira de. IV. Santos Junior, Nicodemos Moreira dos. V. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VI. Ribeiro, Caue. VII. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. VIII. Embrapa Instrumentação. IX. Embrapa Agroindústria Tropical.



## IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA EM QUEIJO

Maria Gardenny R. Pimenta-Martins<sup>1</sup>, Roselayne Ferro Furtado<sup>2</sup>, Maria de Fátima Borges<sup>2</sup>, Luiz Guilherme Dias Heneine<sup>3</sup>, Luiz Henrique Caparelli Mattoso<sup>4</sup>, Paulo Sérgio de Paula Herrmann<sup>4</sup>, Juliano Elvis de Oliveira<sup>4</sup>, Carlucio Roberto Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, Departamento de Química, Fortaleza- CE, <sup>2</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, <sup>3</sup>Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte-MG, <sup>4</sup>Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos –SP. E-mail: roselayne@cnpat.embrapa.br  
**Projeto Componente:** PC 2 **Plano de Ação:** 4

### Resumo

Um biossensor amperométrico para detecção de enterotoxina estafilocócica A (SEA) em alimento a partir da técnica de automontagem foi desenvolvido. Proteína A oriunda de *Staphylococcus sp.* foi utilizada na orientação do anticorpo primário contra SEA. Um sistema sanduíche foi montado sobre superfície de ouro e a resposta foi avaliada por cronoamperometria. O biossensor apresentou uma boa linearidade ( $r = 0.99$ ) na faixa de concentração de 30 a 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SEA e limite de detecção e quantificação de 33,9 e 112  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Palavras-chave:** Biossensor, monitoramento, contaminante biológico, detecção, intoxicação alimentar

### Publicações relacionadas

Pimenta-Martins, M.G.R., Furtado, R.F., Heneine, L.G.D, Borges, M.F., Alves, C.R. Development of an amperometric immunosensor for detection of Staphylococcal enterotoxin A in real sample. In: Anais do XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica - SIBAE, Fortaleza, 2012.

### Introdução

As doenças transmitidas por alimentos constituem um problema crescente de saúde pública e o monitoramento de micro-organismos tem sido um instrumento de grande importância na gestão e controle dos riscos potenciais a saúde humana.

No Brasil, as intoxicações alimentares, apesar de frequentes, principalmente, em alimentos de produção artesanal, são pouco notificadas em relação ao número de pessoas acometidas e aos agentes etiológicos.

O gênero *Staphylococcus* é responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo. Entre as bactérias do gênero, algumas cepas de *S. aureus* produzem uma grande variedade de

exoproteínas capazes de provocar intoxicações, a partir da ingestão da toxina pré-formada nos alimentos [1]. Entre as enterotoxinas estafilocócicas, a enterotoxina tipo A (SEA) é uma das mais importantes envolvidas nos casos de intoxicação alimentar.

No que se refere a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, principalmente em amostras de leite e derivados, a análise é feita por meio de kits baseados em princípios de métodos imunológicos: ensaio imunoenzimático (ELISA), imunodifusão e aglutinação em látex [2]. Estes kits são, geralmente, importados e possuem custo elevado, fato que inviabiliza muitas vezes o uso rotineiro em laboratórios e indústrias. Sendo assim, as análises microbiológicas são voltadas,

principalmente, para detecção do patógeno produtor das enterotoxinas (*Staphylococcus sp.*), apesar da possibilidade de se encontrar as enterotoxinas no alimento após a eliminação do patógeno.

De uma forma geral, os métodos convencionais de detecção de patógenos, transmitidos por alimentos, são realizados a partir da identificação microbiológica e bioquímica dos micro-organismos. Porém, os maiores inconvenientes dos métodos convencionais são o trabalho árduo, o tempo consumido nas análises e o custo que envolve todo o processo, desde preparação da amostra até a identificação do micro-organismo. Uma forma de minimizar estes impactos na segurança dos alimentos seria através do uso de novos dispositivos para detecção de contaminantes biológicos.

Os biossensores são dispositivos bioeletrônicos que representam uma ferramenta alternativa de custo baixo, reprodutibilidade e sensibilidade alta, tempo de resposta relativamente rápido e possibilidade de miniaturização para a detecção de micro-organismos em alimentos. Tais características os qualificam como dispositivos com elevado potencial comercial.

Este trabalho teve o objetivo de desenvolver um imunossensor amperométrico a partir da modificação de superfície de ouro para detecção de enterotoxina estafilocócica tipo A (SEA) em amostras de queijo do tipo Coalho.

## Materiais e métodos

Para a obtenção da enterotoxina estafilocócica tipo A, cepa de *S. aureus* enterotoxigênico foi cultivada em caldo BHI a 37°C por 48 h. A produção das enterotoxinas foi avaliada pelo método de membrana sobre ágar descrito por Hallender [3].

Os anticorpos contra enterotoxina tipo A foram fornecidos pela Fundação Ezequiel Dias e marcados com peroxidase (HRP) [4]. A concentração dos anticorpos marcados com peroxidase foi de 30 µg mL<sup>-1</sup>.

Amostras de queijo artesanal tipo Coalho foram homogeneizadas em 0,85% de solução de NaCl na razão 1:1 (p/v) e centrifugadas a 9.000 x g por 30 min. a 4°C. As amostras de queijo Coalho foram avaliadas previamente quanto a presença de enterotoxinas utilizando kit comercial SET-RPLA test (Oxoid®).

Para a construção do imunossensor, primeiramente, foi realizada a limpeza de eletrodo de ouro (Ø = 0,025 cm<sup>2</sup>) por polimento mecânico da superfície com alumina (0,3 µm); banho ultrasônico em solução de etanol por 5 minutos; imersão em

solução piranha (1:3 - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por 3 minutos e limpeza eletroquímica por 25 varreduras sucessivas em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M na janela de potencial de 0 a 1.5 V.

A montagem do biossensor foi conduzida empregando a técnica de automontagem com tiol e imobilização de proteína A para orientação do anticorpo primário. Eletrodo de ouro foi imerso em solução de 10 mM de cisteamina por 3h seguida pela etapa de imobilização de proteína A oriunda de *Staphylococcus sp.* A imobilização da proteína A sobre a monocamada de tiol foi avaliada por três diferentes métodos de imobilização utilizando: glutaraldeído 2,5% (1h), adsorção física (1h) e ativação dos grupos carboxílicos da proteína A por meio de incubação em solução de EDC (2 mM) e NHS (5 mM). Posteriormente, o eletrodo modificado com tiol e proteína A foi incubado em solução de anti-SEA (100 mg mL<sup>-1</sup>) overnight. Em seqüência, sítios livres do imunossensor foram bloqueados com BSA 1% por 1h. A incubação do eletrodo em solução de SEA (1 mg L<sup>-1</sup>, tampão PBS pH 7,4) e de anticorpos marcados com peroxidase (1 mg mL<sup>-1</sup>) foi realizada por 1 hora/etapa. Após cada passo de imobilização o eletrodo foi lavado com tampão PBS pH 7,4.

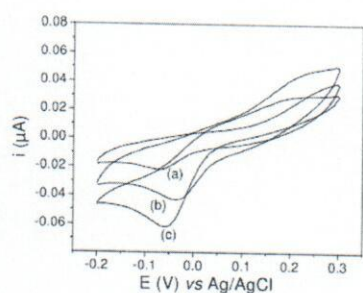
As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula de 10 mL contendo 0,1 M de PBS (pH 7,4). Empregou-se um sistema eletroquímico de três eletrodos utilizando referência de Ag/AgCl e fio helicoidal de platina como auxiliar. A resposta amperométrica foi gerada a partir da reação da peroxidase com 100 µM de peróxido de hidrogênio na presença de 60 µM de hidroquinona. A resposta analítica foi determinada por polarização do eletrodo a -50 mV. Estudos de voltametria cíclica foram realizados para caracterizar as etapas de imobilização nas condições de velocidade de 100 mV s<sup>-1</sup> com potencial de varredura de -0,4 a 0,7 V em solução de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 4 mM com KCl 1 M. As medidas foram realizadas em potenciostato/Autolab/PGSTAT12 com o software GPES (Eco Chemie).

## Resultados e discussão

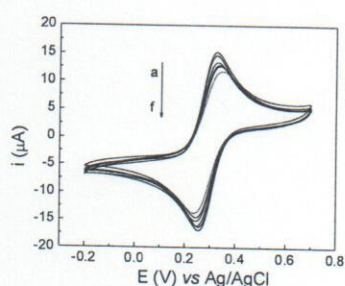
A Fig. 1a indicou um pico catódico mais resoluto e menor corrente capacitiva na resposta do imunossensor que empregou o método de imobilização com EDC/NHS. Assim, este método de imobilização foi utilizado para os ensaios subsequentes. A estabilidade das ligações das biomoléculas do biossensor após ativação do grupo carboxílico da proteína A com EDC/NHS mostrou um coeficiente de variação de 0,33% após 50 ciclos

de varredura indicando uma boa estabilidade do biosistema.

Cada etapa de construção do imunossensor foi caracterizada por voltametria cíclica em solução de 4 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  e 1 M KCl. De acordo com a Fig. 1b, uma diminuição na corrente-resposta é observada no decorrer da montagem do imunossensor relacionada ao aumento do impedimento da reação redox  $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$  próximo a superfície do eletrodo.



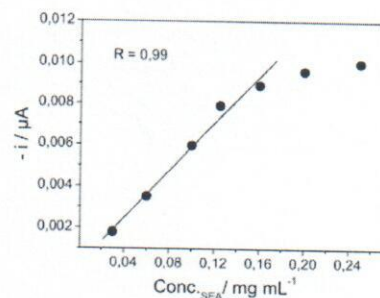
(1a)



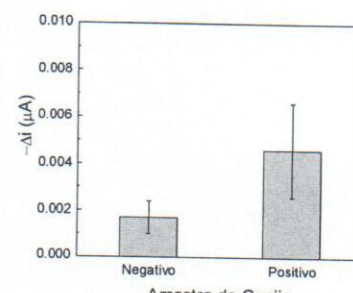
(1b)

Fig. 1. (1a) Voltametria cíclica do biossensor para três métodos de imobilização da proteína A: (a) adsorção física, (b) uso de glutaraldeído, (c) EDC/NHS em tampão PBS pH 7.4 contendo 60  $\mu\text{M}$  hidroquinona and 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . (1b) Voltamogramas cíclicos em solução  $K_3[Fe(CN)_6]$  4 mM com KCl 1 M após cada etapa de construção do biossensor: (a) automontagem com cisteamina; (b) proteína A; (c) BSA; (d) anticorpo primário; (e) SEA; (f) anticorpo secundário marcado com HRP.

O biossensor apresentou boa linearidade ( $r = 0,99$ ) na faixa de concentração de 30 a 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SEA (Fig. 2a). O limite de detecção encontrado foi de 33,9  $\text{ng mL}^{-1}$  e limite de quantificação foi de 112  $\text{ng mL}^{-1}$ . O desempenho do biossensor em amostras reais de queijo coalho também foi avaliado. De acordo com a Fig. 2b o biossensor foi capaz de distinguir amostras de queijo contaminada com SEA e não contaminada. Este resultado indicou o grande potencial de uso do biossensor para detecção de SEA em alimentos.



(2a)



(2b)

Fig. 2. (2a) Curva de calibração para concentrações de SEA. Avaliação do biossensor em amostras de queijo contaminadas e não contaminadas. (2b) Resposta do biossensor em solução PBS pH 7,4 contendo 60  $\mu\text{M}$  de hidroquinona e 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $E_{\text{apf}} = -50 \text{ mV}$ .

## Conclusões

O biossensor construído apresentou resultados bastante satisfatórios na detecção de enterotoxina estafilocócica, inclusive em amostras reais de queijo do tipo Coalho. A presente metodologia poderá ser utilizada em dispositivos portáteis com eletrodos descartáveis visando futura aplicação comercial da tecnologia.

## Agradecimentos

CNPq, FINEP, EMBRAPA, FUNCAP, CAPES

## Referências

1. Veras, J.F.; Carmo, L.S.; Tong, L.C.; Shupp, J. W.; Cummings, C.; Santos, D.A.; Cerqueira, M.M.O.P.; Cantini, A.; Nicoli, J.R.; Jett, M.A. *Int J Infect Dis*, 2008, 12, 410.
2. Pereira, V.; Lopes, C.; Castro, A.; Silva, J.; Gibbs, P.; Teixeira, P. *Food Microbiol.* 2009, 26, 278.
3. Hallander, H.O. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1965. 63, 299.
4. Avrameas, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry*, (1969), 6, 43.