



Desenvolvimento de um sensor microfluídico portátil em papel com duplo sistema de detecção (eletroquímica e colorimétrica) para a detecção de contaminação de amostras de leite por microrganismos e antibiótico tetraciclina

Palavras-Chave: Sensores químicos portáteis, Colorimetria, Sensores eletroquímicos

Autores(as):

Paula Cristine Rocha Corsato, IQ – UNICAMP

Ms. Lucas Felipe de Lima, IQ – UNICAMP

Ms. André Lopes Ferreira (co-orientador), IQ – UNICAMP

Prof. Dr. William Reis de Araujo (orientador), IQ – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

O leite encontra-se entre os 5 produtos alimentícios mais comercializados no mundo¹. Segundo a Global Dairy Platform, aproximadamente 1 bilhão de pessoas dependem diretamente da produção leiteira para sua sobrevivência², tornando-se um produto indispensável na economia mundial para a subsistência populacional.

Após secretado do úbere do animal, o leite fica exposto ao ambiente, o que o torna passível de contaminação por diversos microrganismos, seja por contato com a superfície do úbere e tetos, superfície de utensílios e equipamentos de ordenha ou até mesmo contaminação dentro do próprio úbere no caso de algumas infecções bacterianas, ou ainda por administração de medicamentos veterinários como antibióticos que podem ser excretados através do leite³. Sendo assim, torna-se necessário o monitoramento e controle de qualidade do leite para o adequado consumo e comercialização.

No Brasil, dentre os inúmeros causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), os microrganismos patogênicos como as bactérias (principalmente *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus*) e suas toxinas, promovem diversos problemas de saúde humana⁴. A *Salmonella enterica* pertencente à família Enterobacteriaceae, é uma das mais importantes e relevantes bactérias para a saúde pública devido ao seu alto grau de contágio. Possuem tamanho médio de aproximadamente 2-5 µm por 0,5-1,5 µm, apresentam formato de bacilo, são anaeróbias facultativas e gram-negativas^{5,8}.

A *Salmonella* possui alto grau de 1 patogenicidade, podendo se manifestar nas formas de gastroenterite, febre entérica ou septicemia. As febres entéricas causam mundialmente cerca de 200.000 mortes e 22 milhões de doenças por ano, apresentando maior incidência no Sudeste e na Ásia Central^{8,9}.

Além das bactérias, existem diversos fatores que demonstram a importância do monitoramento de resíduos de antibióticos em leite, entre eles a industrialização e comercialização para o consumo humano, possibilitando o surgimento de diversos problemas de saúde. Alguns dos problemas comumente apresentados vão desde reações alérgicas, dermatites, rinite, urticárias e asma brônquica⁶. Com base nessa problemática, torna-se essencial o monitoramento de resíduos de antibióticos em amostras de leite industrializados, como por exemplo, a tetraciclina.

2. METODOLOGIA:

2.1. Fabricação dos dispositivos colorimétricos e eletroquímicos

A fabricação dos dispositivos colorimétricos e eletroquímicos foi dividida em sete etapas, como demonstrado na Figura 1. Para o desenvolvimento e confecção da geometria desejada do sensor, utilizou-se o software PowerPoint2013. Inicialmente, para a delimitação das regiões de análise no papel foi utilizada uma impressora de cera Xerox® ColorQube 8570 para impressão dos dispositivos em folhas de papel filtro no tamanho A4 (Figura 1A). Após a impressão, as folhas foram submetidas à prensa térmica a 110°C por 1 minuto, para que a cera disposta sobre a superfície da celulose atinja o ponto de fusão, permitindo que ela penetre na estrutura porosa do papel, criando uma barreira hidrofóbica tridimensional, delimitando a área reacional. Na sequência, foi aplicada uma fita crepe larga na região inferior do dispositivo para evitar a perda da solução aquosa pelo outro lado do papel.

Assim, iniciou-se a confecção do sensor eletroquímico na superfície do dispositivo em papel (Figura 1B), por meio da aplicação do *template* dos eletrodos previamente padronizados com auxílio da cortadora laser. Foi realizada a pintura do contra eletrodo e eletrodo de trabalho com tinta condutiva de carbono e o eletrodo de referência com tinta condutiva de Ag/AgCl. Subseqüentemente, os dispositivos em papel foram levados à estufa previamente aquecida a 70°C por 50 minutos para a cura das tintas, com posterior remoção do *template*. Por fim, os contatos elétricos foram pintados com a tinta de Ag/AgCl para promover uma melhor condutividade elétrica, e levado à estufa por mais 10 minutos para cura.

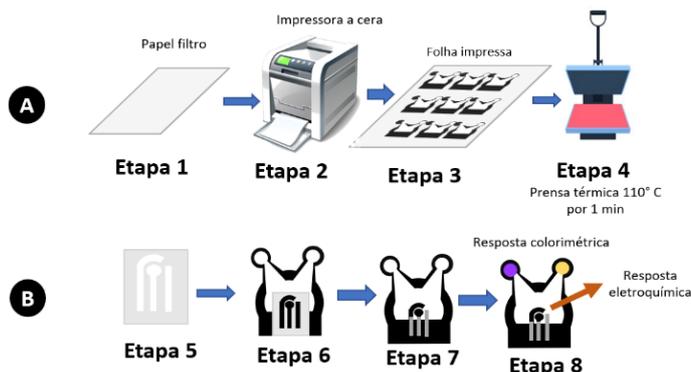


Figura 1. Principais etapas para a fabricação do dispositivo colorimétrico (A) e eletroquímico (B) em papel de filtro.

O eletrodo de trabalho foi modificado com 5 μ L de um composto de nanotubos de carbono funcionalizados com ácido carboxílico (CNT COOH) e polietilenoimina (PEI). A quantificação de tetracilina foi realizada utilizando a técnica de voltametria de Pulso Diferencial (VPD) utilizando os parâmetros step de 07 mV, amplitude de 75 mV e intervalo de tempo de 0,05 s.

Para a dupla detecção, foi realizada a otimização do volume de amostra para o preenchimento completo do dispositivo eletroquímico/colorimétrico, onde definiu-se

que o ideal é uma quantidade maior ou igual a 150 μ L de amostra e a aplicação de 0,6 μ L de substrato (magenta caprilato – MC) nos *spots* de detecção colorimétrica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Otimização de concentração do substrato para a Salmonella

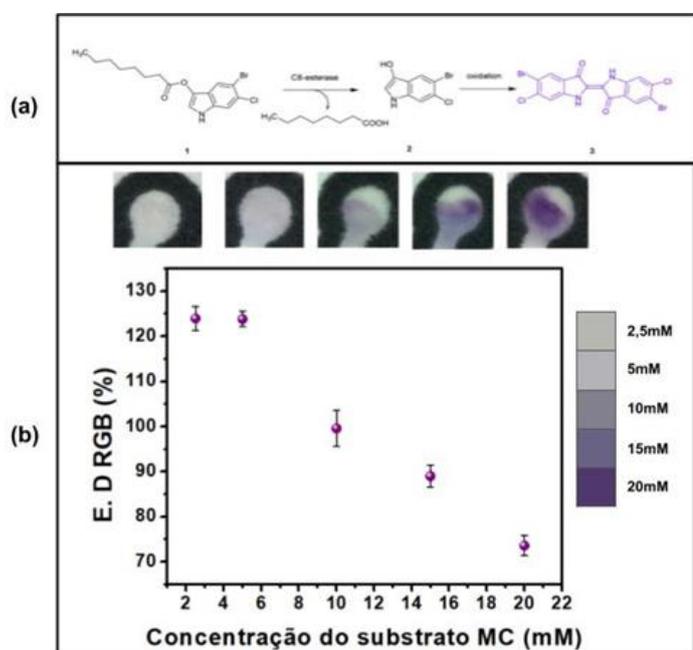
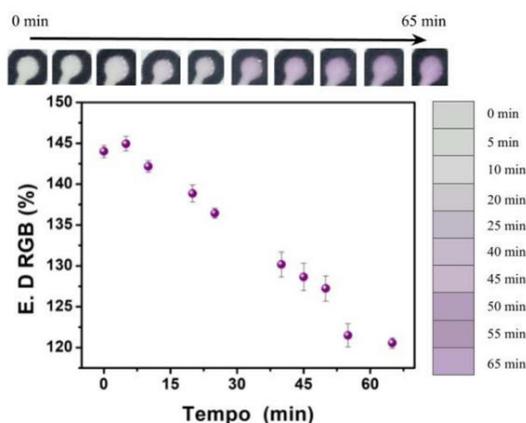


Figura 2. (A) Detecção da salmonella através da reação entre o substrato magenta caprilato (MC) e a esterase. (B) Otimização da concentração do substrato aplicado nos spots em medidas de distância euclidiana (E.D., sigla do inglês) com as respectivas imagens digitais das zonas de detecção e escala relativa de cor para cada condição.

A identificação da Salmonella ocorre de forma indireta, por meio da detecção do biomarcador esterase. Sabendo que o desenvolvimento da coloração no sensor é decorrente de uma reação enzimática da esterase promovendo a clivagem do magenta caprilato, formando um cromóforo de coloração magenta (Figura 2A), a concentração limitada deste substrato pode trazer limitações para a sensibilidade do dispositivo, bem como seu excesso pode acabar encarecendo o produto devido a gastos desnecessário de reagentes. Entendendo este fator, testou-se diferentes concentrações de MC para avaliar qual concentração fornecia a melhor performance do dispositivo desenvolvido, Figura 2B. Para essa otimização foi aplicada 2 vezes a alíquota (0,6 μ L) de cada concentração.

Como observado na Figura 2B, a melhor concentração do substrato (MC) para a detecção da esterase foi de 20 mmol/L, uma vez que esta condição proporcionou maior intensidade de cor e consequentemente menores valores de distância euclidiana (E.D.)

3.2. Otimização do tempo de incubação para aquisição da imagem digital



Tratando-se de uma reação enzimática, é extremamente importante avaliar a cinética reacional para favorecer a escolha do melhor tempo de captura da imagem (melhor resposta analítica). Para tal fim, foram preparados *spots*, em triplicata com MC 20,0 mmol/L e na sequência, adicionou-se 200 μ L de solução contendo esterase 1 U/mL em pH 9,0. Foram adquiridas imagens destes testes em diferentes intervalos de tempo ao longo de 65 min. Posteriormente, os dados de padrões de cor RGB (Red, Green e Blue) foram extraídos e plotados como E.D. em função do tempo.

Figura 3. Otimização do tempo de incubação da amostra no *spot* colorimétrico para a captura da imagem digital ao longo de 65 minutos. Encontram-se inseridas as respectivas imagens digitais do teste, bem como uma escala de cor relativa do teste.

Por meio da porcentagem de E.D. do RGB (Figura 3), pode-se notar uma mudança colorimétrica visual a partir de 20 min, com aumento de intensidade de cor com o decorrer do tempo. A maior intensidade de cor foi observada em 55 min, sendo estipulado este tempo para a captura da imagem.

3.3. Curva analítica para a detecção colorimétrica da esterase

Após a otimização de todos os parâmetros (volume de amostra, concentração de substrato e tempo de incubação para a captura da imagem digital), foi então verificado o desempenho analítico do dispositivo por meio da construção de uma curva analítica com concentrações conhecidas de esterase (0,0, 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 1×10^{-1} , 1,0, 2,5 e 5,0 U/mL), Figura 4.

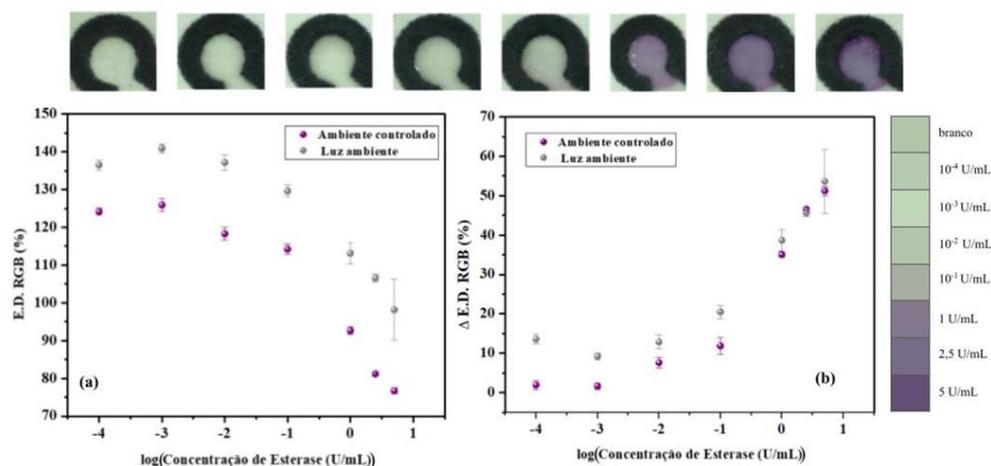


Figura 4. Curva analítica para o biomarcador da *Salmonella spp* (esterase) (a) sem subtrair o branco e (b) subtraindo o branco. As imagens digitais dos spots representam o incremento de concentração, partindo do branco (esquerda) até 5,00 U/mL (direita). Ao lado direito foi montada uma escala de cor relativa do teste.

Nesta etapa, analisou-se também a influência da luz sobre a resposta colorimétrica, para isso, capturou-se as imagens digitais dentro de uma câmara contendo LEDs branco, para evitar variação de luminosidade, e capturados em luz ambiente, isto é, apenas sob luz branca do laboratório. As curvas analíticas podem ser observadas na Figura 4. Quando comparados os gráficos sem a subtração do branco (Figura 4^a) pode-se observar uma grande flutuação entre as curvas, decorrente da diferença e flutuação da luminosidade. Buscando amenizar esta variação, optou-se pelo processamento dos resultados por meio da subtração do branco analítico, com isso houve uma diminuição da variação dos pontos (Figura 4B), desta forma podemos relatar que a análise de concentrações menores possui maior variação se não for feita em ambiente controlado de iluminação. No entanto, vale destacar que para concentrações maiores de esterase ($\geq 1,0$ U/mL), o simples desconto do branco da análise isenta da necessidade de controle rigoroso de iluminação desde que se mantenha a distância focal entre as capturas das imagens.

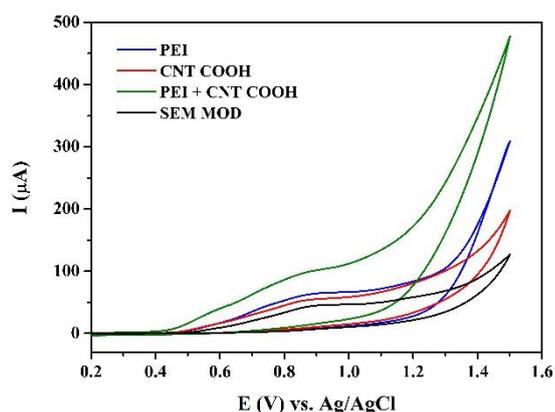
Por fim, observa-se por meio da curva analítica que o dispositivo começa a apresentar resposta visual a partir da concentração de 0,1 U/mL de esterase e de 0,01 U/mL por colorimetria digital.

3.4. Modificação do sensor eletroquímico

Inicialmente, definiu-se qual seria a melhor configuração do sensor no dispositivo colorimétrico, sendo: o sensor fabricado na face superior do dispositivo colorimétrico, tendo contato direto com a amostra, ou o sensor na face inferior do dispositivo, assim a solução entraria em contato com o eletrodo de trabalho através da absorção da amostra pelo papel. Os testes foram realizados utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC) e uma solução de ferricianeto de potássio 1 mmol/L. Notou-se que a configuração do eletrodo por cima do papel proporcionou uma corrente de pico 11,3x maior que a configuração da face oposta. Desta foram, definiu-se então que a configuração otimizada do sensor eletroquímico no dispositivo em papel seria na face superior com contato direto da amostra.

Na sequência, avaliou-se a modificação do sensor para aumento da detectabilidade eletroquímica para a tetraciclina.

Figura 5. Comparação de respostas eletroanalíticas no eletrodo sem modificação, com modificação com CNT COOH, PEI e mistura 1:1 (v/v) de PEI + CNT COOH para a detecção de tetraciclina 50 $\mu\text{mol/L}$. velocidade de varredura de 50 mV/s.



Para o teste de modificação, nota-se uma pequena melhora na resposta analítica, de 22% para a modificação com CNT COOH e de 44% quando utilizado o PEI, individualmente, comparados ao eletrodo sem modificação. Com isso, avaliou-se a performance desses 2 materiais

juntos (PEI + CNT COOH), onde notou-se uma melhora expressiva na corrente de pico, com um aumento de 124% no valor da corrente de pico. Comparando a resposta analítica sem modificação versus com modificação, foi então determinado que o eletrodo seria modificado com a dispersão de PEI + CNT COOH. Essa melhora pode ser explicada principalmente devido ao efeito sinérgico do compósito, no qual os nanotubos de carbono proporcionam uma maior área eletroativa ao eletrodo de trabalho e o PEI, um polímero condutor, melhora a transferência de carga para o processo redox ocorrer, contribuindo positivamente para o aumento da resposta analítica. Após a determinação da modificação utilizada, foi feita a otimização da quantidade de modificante que deveria ser usado no eletrodo de trabalho. Onde, em triplicata, utilizando a técnica de VC foram testados os volumes de 2,5; 5,0; 7,5; 10 μL de dispersão do modificante, sendo escolhido o volume de 5 μL por proporcionar maior corrente de pico e menor variabilidade do resultado.

3.5. Estudo do efeito do pH na resposta voltamétrica da tetraciclina

Para compreender o efeito do pH na resposta eletroquímica da tetraciclina, foi realizado o estudo utilizando a VPD com concentração de tetraciclina de 50 $\mu\text{mol/L}$ em soluções tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol/L com valores de pH de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 9,0; 10,0; 12,0, Figura 6.

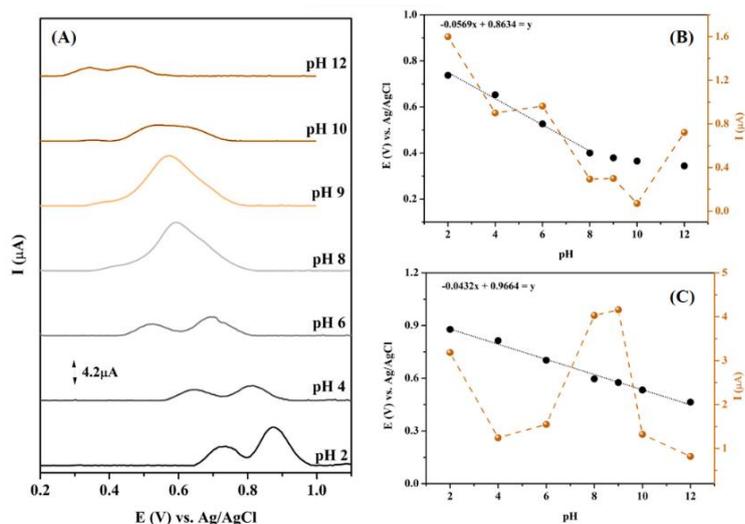


Figura 6: Efeito do pH na resposta eletroquímica para a tetraciclina. (A) Voltamogramas registrados por VPD em tampão BR na faixa de pH de 2,0 a 12,0. (B) Gráfico de potencial de pico e potencial de pico vs pH para o primeiro processo de oxidação da tetraciclina. (C) Gráfico de potencial de pico e corrente de pico vs pH para o segundo processo de oxidação da tetraciclina.

Com este estudo, foi observada a existência de, ao menos, 2 processos irreversíveis de oxidação para a tetraciclina, que corresponde a oxidação do grupo fenol e da amina terciária em sua estrutura.¹⁰ Além disso, nota-se que a medida que o pH aumenta, o pico se desloca para valores menores de potencial de oxidação, até uma certa estabilização no pH 8 para o primeiro pico (Figura 6B). Além disso, também foi possível observar uma resposta linear entre o potencial e o pH, nos valores de 2 a 8. Chegando a um coeficiente angular de 57 mV/pH, o que indica um processo que envolve uma razão de 1:1 entre prótons e elétrons. Enquanto no segundo pico de oxidação também foi obtido um comportamento linear entre potencial vs. pH, entre 2 e 12. Adicionalmente, foi possível observar que o segundo pico possui uma corrente mais intensa que o primeiro, por isso foi verificado que, buscando a otimização dos parâmetros analíticos, o pH 9 seria a escolha ideal, pois é o que dá uma maior corrente de pico de oxidação, além de também ser o pH ótimo (enzimático) utilizado para a identificação colorimétrica da esterase. Dessa forma podemos manter o pH para ambos os analitos, sem a necessidade de correção de pH no canal do dispositivo para a detecção colorimétrica integrada posteriormente.

3.6. Curva analítica para a tetraciclina

Anteriormente a construção da curva analítica, avaliou-se a repetibilidade de análises no mesmo sensor, por meio de 10 medidas sucessivas, onde foi observado que já na segunda medida houve uma supressão de sinal de 3 vezes quando comparado ao primeiro sinal obtido. Demonstrando assim o caráter adsorptivo da molécula. Assim, foi realizado os ensaios voltamétricos para a construção da curva analítica em eletrodos diferentes, Figura 7. Vale destacar que o caráter adsorptivo não é um problema, uma vez que o sensor possui baixo custo e o uso de dupla detecção só permitiria uma única análise por dispositivo.

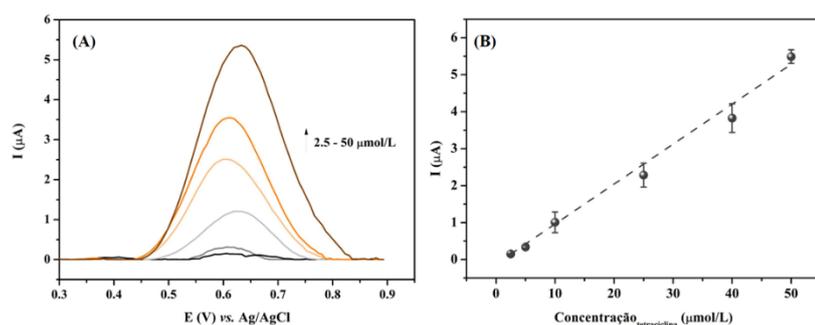


Figura 7: (A) VPDs obtidos no intervalo de concentração de tetraciclina de 2,5 – 50 $\mu\text{mol/L}$ utilizando tampão BR 0,1 mol/L pH = 9 e diferentes sensores. (B) Curva analítica da tetraciclina. Todos os voltamogramas tiveram sua linha de base corrigida usando a função *moving average* do software Nova 2.1. Estudos realizados em duplicata (n = 2).

Nota-se baixos valores de desvio padrão na construção da curva analítica, o que demonstra a adequada reprodutibilidade do método de *stencil-printing* para a fabricação do dispositivo. O método apresentou um regime linear, com R^2 de 0,991 na faixa de 2,5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 7B). Utilizando o desvio padrão de 10 brancos analíticos e o *slope* da curva, foi possível calcular o LD e LQ como 0,23 $\mu\text{mol/L}$ e 0,76 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. Considerando as normas do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC)¹¹, é regulamentado no Brasil que não pode possuir mais de 0,22 $\mu\text{mol/L}$ de tetraciclina em amostras de leite. Assim, estudos visando aumentar a detectabilidade do método de forma a incluir níveis menores de concentração na curva analítica ainda estão sendo realizados. Além disso, estudos de recuperação de tetraciclina em diferentes níveis de concentração em amostras de leite de diferentes procedências serão realizadas em breve.

4. CONCLUSÕES:

Este projeto visou a fabricação de um sensor em papel com dupla detecção, colorimétrica e eletroquímica, de forma a ser possível avaliar contaminantes no leite, sendo eles um biomarcador de *Salmonella spp* e o antibiótico tetraciclina. Foi possível avaliar a interferência da luminosidade e da distância focal para a análise colorimétrica, o tempo ideal para a captura das imagens, além de otimizar a quantidade de substrato necessário para a reação ocorrer, com isso construiu-se então a curva analítica para a *Salmonella* em função da quantidade de enzima esterase e foi possível detectar valores a partir de 0,01 U/mL utilizando a colorimetria digital. Já para o sensor eletroquímico, foi realizado o estudo de fabricação dos eletrodos sobre o dispositivo em papel, além da avaliação do modificante, onde foi escolhido PEI + CNT COOH que proporcionou um incremento de 124% do sinal analítico da tetraciclina quando comparado ao sensor sem modificação. Otimizou-se a quantidade de modificante e realizado o estudo de pH, onde notou-se uma dependência do pH para os processos de oxidação da tetraciclina, no qual observou-se um deslocamento dos picos para menores valores de potenciais com o aumento do pH. Realizou-se a construção da curva analítica utilizando a técnica de VPD, onde se obteve um regime linear de resposta na faixa de concentrações de 2,5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ e um LD e LQ de 0,23 e 0,76 $\mu\text{mol/L}$.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos o fomento a esta pesquisa concedido pelo CNPq e as demais agências de fomento (CAPES e Fapesp Processos: 2022/03250-7 e 2018/08782-1) pelo suporte direto ou indireto a este projeto.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 Schmidt, V. and da Silveira, R. C. (2021). Zootec. Pesqui. e práticas Contemp. - Vol. 2, 210–220.
- 2 Global Dairy Platform, Glob. Dairy Platf., 2016, 1–20.
- 3 Santos, M. V. D., & Fonseca, L. F. L. D. (2001). Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. Revista Higiene Alimentar, 15(82), 13-19.
- 4 Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção, <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>, (accessed 5 October 2022).
- 5 de Melo, E. S. et al (2018). Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. Pubvet, 12, 131.
- 6 Ministério da Saúde, Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos, 2010.
- 7 Váradi, L., Luo, J. L., Hibbs, D. E., Perry, J. D., Anderson, R. J., Orenge, S., & Groundwater, P. W. (2017). Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. Chemical Society reviews, 46(16), 4818–4832.
- 8 Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. The Scientific World Journal, 1.
- 9 Crump, J. A., Luby, S. P., & Mintz, E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. Bulletin of the World Health Organization, 82(5), 346-353.
- 10 Stephens, C. R., Murai, K., Brunings, K. J., & Woodward, R. B. (1956). Acidity constants of the tetracycline antibiotics. Journal of the American Chemical Society, 78(16), 4155-4158.
- 11 Brazil, Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), MAPA Instrução Normativa SDA No. 11, 7, 2014.