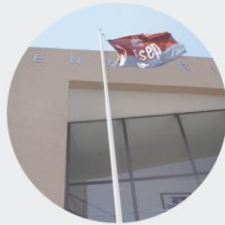


INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM COMPUTAÇÃO E INSTRUMENTAÇÃO MÉDICA



Desenvolvimento de um Método Potenciométrico para Deteção de *Salmonella typhimurium*

NÁDIA FILIPA DURÃO DA SILVA
Outubro de 2013



Desenvolvimento de um Método Potenciométrico para Deteção de *Salmonella typhimurium*

Nádia Filipa Durão da Silva

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica

Orientadores: Doutora Maria Teresa P Oliva Teles
Doutora Júlia M. C. S. Magalhães

Instituto Politécnico do Porto

2013

AGRADECIMENTOS

Às minhas Orientadoras Doutora Teresa Teles e Doutora Júlia Magalhães agradeço toda a disponibilidade, tempo, dedicação e apoio que me deram no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pela oportunidade que me deram, pelo risco que assumiram e por acreditarem em mim ao longo de todo o trabalho. Muito obrigada pelos conhecimentos e pelo gosto que me transmitiram pela investigação.

À Doutora Cristina Delerue-Matos agradeço por me ter encaminhado na escolha do projeto e, por ter permitido a utilização do laboratório do GRAQ/REQUIMTE para desenvolvimento da minha tese de mestrado.

Aos colegas de laboratório e amigos, que me apoiaram ao longo de todo o meu trabalho. Obrigada por todas as conversas de incentivo e por serem tão bons ouvintes.

Por último, agradeço aos meus pais, irmãs, pelo carinho e apoio que sempre me deram.

RESUMO

A *Salmonella* é um microrganismo responsável por grande parte das doenças alimentares, podendo por em causa a saúde pública da área contaminada. Uma deteção rápida, eficiente e altamente sensível é extremamente importante, sendo um campo em franco desenvolvimento e alvo de variados e múltiplos estudos na comunidade científica atual.

Foi desenvolvido um método potenciométrico para a deteção de *Salmonellas*, com elétrodos seletivos de iões, construídos em laboratório com pontas de micropipetas, fios de prata e sensores com composição otimizada. O elétrodo indicador escolhido foi um ESI seletivo a cádmio, para redução da probabilidade de interferências no método, devido à pouca abundância do cádmio em amostras alimentares. Elétrodos seletivos a sódio, elétrodos de Ag/AgCl de simples e de dupla junção foram também construídos e caracterizados para serem aplicados como elétrodos de referência. Adicionalmente otimizaram-se as condições operacionais para a análise potenciométrica, nomeadamente o elétrodo de referência utilizado, condicionamento dos elétrodos, efeito do pH e volume da solução amostra.

A capacidade de realizar leituras em volumes muito pequenos com limites de deteção na ordem dos micromolares por parte dos ESI de membrana polimérica, foi integrada num ensaio com um formato não competitivo ELISA tipo sanduíche, utilizando um anticorpo primário ligado a nanopartículas de Fe@Au, permitindo a separação dos complexos anticorpo-antigénio formados dos restantes componentes em cada etapa do ensaio, pela simples aplicação de um campo magnético. O anticorpo secundário foi marcado com nanocristais de CdS, que são bastante estáveis e é fácil a transformação em Cd²⁺ livre, permitindo a leitura potenciométrica. Foram testadas várias concentrações de peróxido de hidrogénio e o efeito da luz para otimizar a dissolução de CdS. O método desenvolvido permitiu traçar curvas de calibração com soluções de *Salmonellas* incubadas em PBS (pH 4,4) em que o limite de deteção foi de 1100 CFU/mL e de 20 CFU/mL, utilizando volumes de amostra de 10 µL e 100 µL, respetivamente para o intervalo de linearidade de 10 a 10⁸ CFU/mL. O método foi aplicado a uma amostra de leite bovino. A taxa de recuperação média obtida foi de 93,7% ± 2,8 (média ± desvio padrão), tendo em conta dois ensaios de recuperação efetuados (com duas réplicas cada), utilizando um volume de amostra de 100 µL e concentrações de 100 e 1000 CFU/mL de *Salmonella* incubada.

Palavras- chave: Salmonella, imunoenensaio, nano-particulas, potencimetria.

ABSTRACT

Salmonella is an organism responsible for the majority of foodborne illness, which may concern public health from contaminated area. A fast, efficient and highly sensitive detection are extremely important, being a rapidly developing field and today is a target in varied and multiple studies in the scientific community.

We developed a potentiometric method for detection of *Salmonella* with ion-selective electrodes, built in the laboratory with micropipettes tips, silver wires and optimized sensors compositions. The indicator electrode chosen was highly selective for cadmium, to reduce the likelihood of interference in the method, due to the low abundance of cadmium in food samples. Microelectrodes sodium electrodes, Ag/AgCl single and double junction electrodes have also been constructed and characterized to be applied as reference electrode. In addition was optimized the operating conditions for potentiometric analyses, like a particular reference electrode, conditioning of the electrodes, the effect of pH and volume of the sample solution.

The capacity of reading in very small volumes with limits of detection in the order of micromolar by the ESI polymeric membrane has been integrated in a test using a format ELISA noncompetitive sandwich using a primary antibody labeled with nanoparticles of Fe@Au, allowing separation of antibody-antigen complexes formed from the remaining components at each step of the assay, by the simple application of a magnetic field. The secondary antibody was labeled with CdS nanocrystals that are stable and easy processing into free Cd²⁺, enabling the potentiometric reading. We tested various concentrations of hydrogen peroxide and the effect of light to optimize the dissolution of CdS NC. The method developed allows us to trace calibration curves made with solutions of *Salmonella* incubated in PBS (pH 4.4) with different concentrations, having reached the limits of detection of 1100 CFU/mL and 20 CFU/mL using sample volumes of 10 µL and 100 µL, respectively, in the linearity interval of 10 to 10⁸ CFU/mL. The average recovery rate obtained was 93.7% ± 2.8 (mean ± standard deviation) taking into account two assays recovery made (each one with two replicates) using 100 µL sample volume and concentrations of 100 and 1000 CFU/mL of incubated *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella*, immunoassay, nano-particles, potentiometry.

ÍNDICE

1.1. Considerações gerais	11
1.2. <i>Salmonella</i> spp	11
1.3. Métodos de análise de <i>Salmonellas</i>	14
1.3.1. Cultura e contagem de colónias	14
1.3.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	15
1.3.3. Biossensores.....	15
1.3.4. Ensaio imunológico.....	17
1.3.4.1. ELISA	17
1.3.5. Transdutores	19
1.3.5.1. Transdutores de Massa ou Piezoelétricos.....	19
1.3.5.2. Transdutores Óticos.....	19
1.3.5.3. Transdutores eletroquímicos.....	20
1.4. Elérodos Seletivos de Iões.....	21
1.4.1. Caracterização de um ESI.....	24
1.5. Nano-partículas em Imunoensaios Eletroquímicos	27
1.6. Objetivos.....	28
2.1. Reagentes e Soluções	30
2.2. Materiais e Equipamentos.....	31
2.3. Construção dos Elérodos	32
2.3.1. Elérodos de Ag/AgCl	32
2.3.2. Microelérodos.....	34
2.4. Caracterização dos eléctrodos.....	35
2.5. Dissolução dos Nanocristais de CdS	36
2.6. Determinação Potenciométrica da <i>Salmonella typhimurium</i>	37
3.1. Caracterização dos eléctrodos.....	39
3.1.1. Microelérodos de sódio.....	39
3.1.2. Microelérodos de cádmio.....	41
3.2. Dissolução dos Nanocristais de CdS	49
3.3. Determinação Potenciométrica da <i>Salmonella typhimurium</i>	56
3.3.1. Determinação Potenciométrica da <i>Salmonella typhimurium</i> em amostras de leite	58
Referências	62

LISTA DE FIGURAS

Figura:1.1-Distribuição da <i>Salmonella typhimurium</i> na União Europeia.....	15
Figura:1.2 - Esquema representativo da constituição de um imunossensor [1]	19
Figura: 1.3 - Formatos de ensaios imunológicos: ensaio direto, indireto e de captura “Sandwich” para a variante Antígeno (Ag) [2].....	20
Figura:1.4 - Distribuição de cátions de C^+ e aniões de A^- entre uma fase aquosa (que representa a solução amostra) e uma fase orgânica imiscível (que representa a membrana) [3].....	24
Figura:1.5 - Esquema de uma célula potenciométrica.....	25
Figura:1.6 - Curva de calibração típica de um ESI [4].....	27
Figura:2.1 - Fórmulas químicas dos ionóforos de cádmio (A) e de sódio (B).....	32
Figura:2.2 - Medidor de pH, Metrohm 780	33
Figura:2.3 - Fonte de alimentação ISO-TECH (A) e, matriz de contato e resistência variável (B)	34
Figura:2.4 - Esquema do circuito em série construído para a anodização do fio de prata	35
Figura:2.5 - Fio de Ag recoberto com AgCl (referência Ag/AgCl)	35
Figura:2.6 - Configuração de um microeléctrodo seletivo de iões, construído numa ponta de 200 μ L [5]	37
Figura:2.7 - Esquema do ensaio utilizado para a determinação potenciométrica da <i>Salmonella typhimurium</i>	40
Figura:2.8 - Aglomeração das partículas magnéticas através da ação de um campo magnético	40
Figura:3.1 - Curva de calibração típica de um microeléctrodo de sódio, obtido com soluções padrão de $NaNO_3$	42
Figura:3.2 - Distribuição dos valores de declive da resposta dos eléctrodos de sódio N° 1 e 2, obtida através de 5 calibrações efetuadas em cinco dias diferentes ao longo duma semana.....	43

Figura:3.3 - Curvas de calibração obtidas para três ESI-Cd, com diferentes tempos de condicionamento (5, 24 e 48 horas), numa solução de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol/L (elétrodo de referência: Ag/AgCl comercial).....	44
Figura:3.4 - Curvas de calibração dos elétrodos de cádmio E1, E3 e E4, obtidas após 48 horas de condicionamento em diferentes concentrações de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	44
Figura:3.5 - Gráfico representativo de três calibrações consecutivas efetuadas no mesmo dia, para o mesmo eletrodo de cádmio, efetuadas segundo as regras da IUPAC (2 calibrações ordem crescente, seguidas de 1 calibração ordem decrescente de concentração).....	45
Figura:3.6 - Gráfico representativo de duas calibrações consecutivas, utilizando 100 mL e 1,5 mL de solução padrão, efetuadas com o mesmo eletrodo ESI-Cd e ER-Ag.....	47
Figura:3.7 - Gráfico representativo duma curva de calibração, utilizando um volume de 20 μL de solução amostra.....	48
Figura:3.8 - Curvas de calibração realizadas no mesmo dia com o mesmo ESI-Cd, utilizando como elétrodos de referência um eletrodo de Ag/AgCl de dupla junção e um ESI- Na^+ (utilizado como pseudoreferência), num volume de 100 mL de solução.....	50
Figura:3.9 - Variação do potencial ao longo do tempo, resultante da dissolução de diferentes concentrações de nanocristais de CdS (obtidas por diluição prévia de 10 e 100 vezes da suspensão mãe) em peróxido de Hidrogénio 3% v/v, utilizando um ESI-Cd e um de Ag/AgCl de dupla junção como referência e um volume final de 160 μL	52
Figura:3.10 - Valores da diferença de potencial medidos com um ESI-Cd e um ESI-Na como pseudoreferência e ao fim de 30 min de dissolução de nanocristais de CdS, com diferentes concentrações iniciais (obtidas por diluição prévia de 100, 200, 250, 400 e 500 vezes da suspensão mãe).....	53
Figura:3.11 - Gráfico representativo da resposta do eletrodo à amostra (volume = 160 μL) fortificada com diferentes concentrações de Ab-NC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	55
Figura:3.12 - Resposta potenciométrica à dissolução dos NC de CdS, através de soluções com concentrações diferentes de Ab-NC e volumes finais de 125 e 130 μL :	

A) [Ab-NC] = $1,0 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, utilizando um volume final de 125 μL (10 μL + 110 μL H_2O_2 3% v/v+ de PBS + 5 μL conjugado Ab-NC (0,0025 $\mu\text{g/mL}$);

B) [Ab-NC] = $1,92 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ utilizando um volume final de 125 μL (10 μL + 110 μL H_2O_2 30% v/v+ de PBS 10 μL Ab-NC (0,0025 $\mu\text{g/mL}$);

C) [Ab-NC] = $3,2 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$ utilizando um volume final de 130 μL (10 μL + 110 μL H_2O_2 50% v/v+ de PBS 10 μL Ab-NC (0,0042 $\mu\text{g/mL}$).....56

Figura:3.13 - Gráfico representativo da resposta de um ESI-Cd, a amostras (volume = 20 μL) fortificadas com diferentes concentrações de Ab-NC57

Figura:3.14 - Detecção potenciométrica de *salmonellas* incubadas em PBS pH 4,4, com uma pré-concentração de 10 μL59

Figura:3.15 - Detecção potenciométrica de *salmonellas* incubadas em PBS pH 4,4, utilizando 100 μL de solução de *Salmonellas* na pré-concentração60

LISTA DE TABELAS

Tabela:1.1- Esquema de Kauffmann-White: espécies, subespécies e serotipos da Salmonella [6]	15
Tabela:1.2 - Método eletroquímicos para detecção de microrganismos	22
Tabela:3.1 - Parâmetros da curva de calibração de elétrodos condicionados em diferentes soluções de Cd(NO ₃) ₂	46
Tabela:3.2 - Comparação das características da resposta dos ESI para cádmio, de acordo com o volume da solução amostra.....	49
Tabela:3.3 - Recuperação Absoluta (%) da <i>Salmonella typhimurium</i> (1×10 ² e 1×10 ³ CFU/mL), em amostras de leite bovino.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Anticorpo
Ab-NC	Conjugado Anticorpo-Nanocristais
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CdS	Sulfureto de Cádmiio
CFU	Unidades formadoras de colónias, (<i>Colony forming units</i>)
CV	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
ER-Ag	Eléctrodo de referência de Ag/AgCl
ESI	Eléctrodo Seletivo a Ião
ESI-Cd	Eléctrodo Seletivo a catião Cd ²⁺
ESI-Na	Eléctrodo Seletivo a catião Na ⁺
Fe@Au	Nano-partículas magnéticas de ferro recobertas com Ouro
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	Limite de Deteção
NaTFB	Tetraquis[3,5-bis(trifluorometil)fenilborato
NC	Nano-Cristais
NP	Nano - Partículas
NPM	Nano - Partículas Magnéticas
NPOE	2-Nitrofenil octil eter
NTC	Nanotubos de Carbono
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia (<i>Polimerase Chain Reactions</i>)
PVC	Cloreto de Polivinilo
QD	Pontos Quânticos (<i>Quantum Dots</i>)
<i>r</i>	Coeficiente de correlação
TCPB	Tetraquis-p-clorofenilborato de potássio
WHO	World Health Organization

INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Os produtos alimentares contêm frequentemente uma grande quantidade de microrganismos, especialmente bactérias, por grama de produto, que estão principalmente localizados à sua superfície. Se um alimento não for devidamente acondicionado ocorre contaminação, os microrganismos multiplicam-se e, as propriedades nutricionais e químicas dos alimentos são alteradas.

Está provado que 90% das doenças com origem alimentar são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos [7]. Segundo a *World Health Organization* (WHO) a salmonelose causada pela *Salmonella* foi a doença de natureza alimentar mais frequente em 2001, em todo o mundo, seguida pelas gastroenterites alimentares. A *Salmonella spp* é também considerada pela WHO, como um microrganismo de provável utilização em bioterrorismo [8].

Assim, é bastante importante a deteção e identificação precoce deste elemento patogénico, para garantir a manutenção da saúde pública e economia do país ou zona contaminada [8]. O desenvolvimento de ensaios imunológicos com deteção eletroquímica (voltametria, potenciometria, amperometria, condutimetria e impedimetria) e usando nano-partículas magnéticas (NPM) para a preparação das amostras proporciona métodos de identificação e análise microbiana rápidos, sensíveis, económicos e de fácil de execução [9]. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método potenciométrico otimizado para a deteção de *Salmonellas* em amostras alimentares.

1.2. *Salmonella spp*

A *Salmonella* foi nomeada em 1884 pelo bacteriologista *D.E. Salmon*, que isolou pela primeira vez *Salmonellas choleraesuis* do intestino de um suíno. A

Salmonella pertence a uma classe de organismos bacterianos com alta similaridade genética [10] e pertence à família *Enterobacteriaceae*. São gram-negativas, têm forma de bastonete com flagelos peritricosos (móveis), não são capazes de formar esporos e degradam a glicose, sendo preferencialmente encontradas no trato intestinal do homem e de animais [7].

Esta classe é dividida em duas espécies, a *Salmonella enterica* e a *Salmonella bongori*, recentemente classificada como uma espécie distinta [11]. A espécie *Salmonella enterica* é ainda dividida em sete subespécies, classificadas segundo os números Romanos, I, II, IIIa, IIIb, IV, VI e, VII [11, 12]. A serotipagem das várias subespécies de *Salmonellas* é bastante complexa, tendo já sido identificados 2463 serotipos diferentes de *Salmonellas* (Tabela 1.1) [13]. As nomenclaturas mais usuais recomendam a divisão da classe de *Salmonellas* em espécie, subespécie, subgênero, grupos, subgrupos e, em serotipos de forma inconsistente, causando alguma confusão de comunicação entre a comunidade científica, hospitais e laboratórios de análise e de saúde pública. Para assegurar a uniformização de nomenclaturas das espécies de *Salmonella* foram definidas fórmulas antigénicas de classificação pela WHO em colaboração com o Centro de Referência e Investigação da *Salmonella*, do Instituto Pasteur, em Paris, França [6, 13, 14]. Os novos serotipos identificados são listados de forma regular, no esquema de Kauffmann-White. O código internacional de nomenclatura bacteriológica refere também que o genótipo de *Salmonella spp*, deve ser rotulado como *Salmonella enterica*, e o serotipo *Salmonella typhimurium* como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo typhimurium ou simplesmente *Salmonella typhimurium*, (Tabela 1.1) [15].

A infeção por *Salmonellas* ocorre sobretudo pela ingestão de água e de alimentos contaminados tais como ovos, aves e produtos láteos. Recentemente, as frutas e legumes também foram identificadas como veículos preferenciais de contaminação [16]. A salmonelose pode originar diferentes tipos de doenças no ser humano, sendo a febre tifoide e a gastroenterite as mais predominantes. A gastroenterite pode ser causada por mais de 150 serotipos de *Salmonellas* diferentes. A *Salmonella typhimurium* e a *Salmonella enteritidis* são os serotipos mais comuns e, a *S. typhimurium* DT104 foi identificada como um dos serotipos mais perigosos por apresentar multirresistência [7, 17]. Todos os anos surgem 16 milhões de novos casos de febre tifoide e 1,3 biliões de casos de gastroenterite em todo o mundo, provocando cerca de 3 milhões de mortes devido à infeção pela salmonela [17].

Tabela:1.1- Esquema de Kauffmann-White: espécies, subespécies e serotipos da Salmonella [6].

Espécie e Subespécies	Nº de Serotipos
S. enterica subsp. enterica (I)	1 454
S. enterica subsp. salamae (II)	489
S. enterica subsp. arizonae (IIIa)	94
S. enterica subsp. diarizonae (IIIb)	324
S. enterica subsp. Houtenae (IV)	70
S. enterica subsp. Indica (VI)	12
S. bongori (V)	20
Total	2 463

Na União Europeia são reportados anualmente cerca de 100 000 casos de salmonelose [18]. A maior parte dos países da União Europeia têm uma incidência de 0-5 casos de salmonelose por 100 000 amostras, como é o caso de Portugal, Espanha, Itália e, existem alguns países com taxas de incidência superiores, entre os 10 – 25 casos em 100 000, como é o caso da Alemanha, Finlândia e Noruega (Figura 1.1).

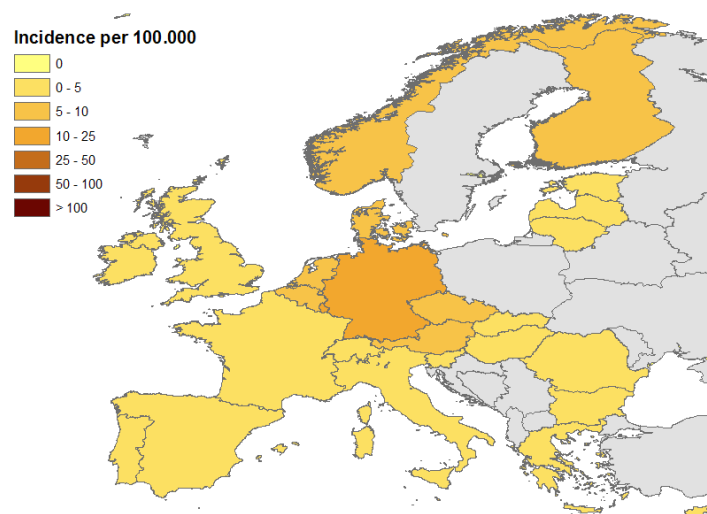


Figura:1.1 - Distribuição da *Salmonella typhimurium* na União Europeia. (Fonte:<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8016>)

Em Portugal, entre 2004 e 2008 foram notificados anualmente 456 casos de salmonelose, 82% dos quais em crianças com menos de 15 anos de idade. Os números registados nos países industrializados, tais como Portugal, estão relacionados com as condições higieno-sanitárias, a disponibilidade de água potável, o modo de armazenamento e métodos de preparação dos alimentos empregues. No entanto, tem-se verificado que o número de casos de salmonelose tem aumentado, devido à globalização e a alteração dos hábitos alimentares [19].

1.3. Métodos de análise de *Salmonellas*

Os processos convencionais de análise de *Salmonellas* baseiam-se na cultura e contagem de colónias, métodos de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “*Polimerase Chain Reaction*”, PCR) e métodos imunológicos [20]. Estas técnicas envolvem respetivamente, contagem de bactérias, análise de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) e interações antigénio-anticorpo. Por vezes, para se obter resultados mais consistentes, os métodos são combinados, ou seja, a mesma amostra é submetida a diferentes processos de análise.

O desenvolvimento de biossensores para deteção de elementos patogénicos, tais como a *Salmonella*, têm vindo a ganhar especial importância na indústria alimentar [20], devido à potencial diminuição do tempo necessário para a obtenção de resultados e facilidade de utilização.

1.3.1. Cultura e contagem de colónias

Os métodos convencionais recomendados em 2002 pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), e pela Comissão Europeia para a Standardização (CEN), para a deteção de salmonelas em amostras alimentares envolvem a mistura do produto alimentar num meio de cultura para pré-enriquecimento por forma a aumentar a população do organismo alvo [21]. Este procedimento é seguido por um processo de seleção, efetuado muitas vezes através de placas diferenciais de ágar, para isolamento das culturas puras, que são posteriormente examinadas por análise fenotípica ou de marcadores metabólicos, que permitem a identificação e serotipagem dos microrganismos. Estes métodos apresentam algumas desvantagens tais como a necessidade de trabalhos intensivos

por parte de peritos e a demora de 2-3 dias para que os resultados sejam conhecidos e até 7-10 dias para confirmação [8].

1.3.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Recentemente têm sido desenvolvidos métodos baseados em sondas de ácido nucleico e PCR, na tentativa de eliminar a necessidade de etapas de pré-processamento [22] que são bastante morosas. Os métodos de PCR baseiam-se no isolamento, amplificação e quantificação de uma pequena porção de ADN, na qual está contido o material genético da bactéria em estudo, pelo que têm um potencial de detecção patogénico único [20], são mais rápidos do que os métodos de contagem de colónias (em geral são necessárias 24 horas para obter um resultado negativo) [23], mas requerem equipamentos relativamente caros e especialistas treinados para a realização da análise. Por outro lado, estes métodos não permitem distinguir entre células viáveis e não viáveis uma vez que se baseiam na detecção do ADN.

1.3.3. Biossensores

Os biossensores usam uma combinação de recetores biológicos (anticorpos, enzimas, ácido nucleico) e de transdutores físicos ou físico-químicos, para gerar um sinal mensurável, proporcional à concentração do analito em estudo [24-27]. São utilizados maioritariamente para observações em tempo real, relativas ao estudo de um evento biológico específico (ex. interação anticorpo - antigénio), utilizando um processador de sinal para análise do sinal adquirido [9]. Desde que Clark e Lyon desenvolveram o primeiro biossensor para a detecção da glucose, em 1962, que os biossensores têm sido estudados intensamente e, utilizados em várias aplicações nas áreas da saúde pública, ambiental e alimentar [8, 9, 24, 25, 27-30].

Os diferentes tipos de biossensores podem ser classificados de acordo com o mecanismo que confere especificidade biológica, pelo modo de transdução do sinal ou, em alternativa, uma combinação dos dois [31]. Na primeira categoria, os biossensores podem ser classificados pelo tipo de biorrecetor, como por exemplo, os enzimáticos, geno-sensores, imunossensores. Relativamente ao método de transdução, podem ser classificados como eletroquímicos, óticos ou piezoelétricos [9].

Os biorrecetores são espécies biológicas ou sistemas biológicos que usam um mecanismo bioquímico para reconhecimento de um elemento patogénico, tal como a *Salmonella*, estabelecendo assim a interface entre um analito de interesse e o sensor. Estas espécies garantem também a minimização de uma possível interferência com

outros componentes da amostra em estudo [7]. Nestes tipos de biossensores existem os bio-catalíticos e os de bioafinidade.

Os biossensores catalíticos são baseados na reação de catálise de macromoléculas, em que os componentes biológicos podem ser enzimas (os mais utilizados [2]), células inteiras ou partículas (microrganismos, bactérias, mitocôndrias, etc.) ou porções de tecido animal ou vegetal [31]. Nos últimos tempos, os microrganismos, tais como bactérias [1], têm sido escolhidos como alternativa ao uso de enzimas, pois podem ser produzidos em grande escala através de cultura celular, são facilmente manipulados e, apresentam uma maior estabilidade e viabilidade *in vitro*.

Os biossensores de bio-afinidade monitorizam o evento de ligação, através de proteínas específicas (receptores membranares), de ácidos nucleicos, de anticorpos ou substâncias relacionadas com o reconhecimento biomolecular. Os biossensores que apresentam como componente biológico uma substância de reconhecimento molecular, um anticorpo ou fragmentos de anticorpos, denominam-se de imunossensores [1].

Os transdutores baseiam-se em propriedades físico químicas, intrínsecas da amostra e da parte biológica que integra o biossensor, tais como a transferência de elétrões, de massa ou de calor, dando origem a biossensores óticos, de massa/piezoelétricos e eletroquímicos, em que o complexo anticorpo-antigénio encontra-se à superfície do transdutor [9]. Na *Figura 1.2* pode-se observar as etapas de aquisição e processamento de sinal, que pode ser realizado direta ou indiretamente, para os diferentes métodos de transdução. Os sensores de atuação direta estão preparados para detetar alterações físicas durante a formação do complexo anticorpo-antigénio, em tempo real, ao contrário dos sensores indiretos que utilizam marcadores para gerar o sinal que por sua vez permitem um modo de deteção mais versátil quando incorporados no complexo [1].

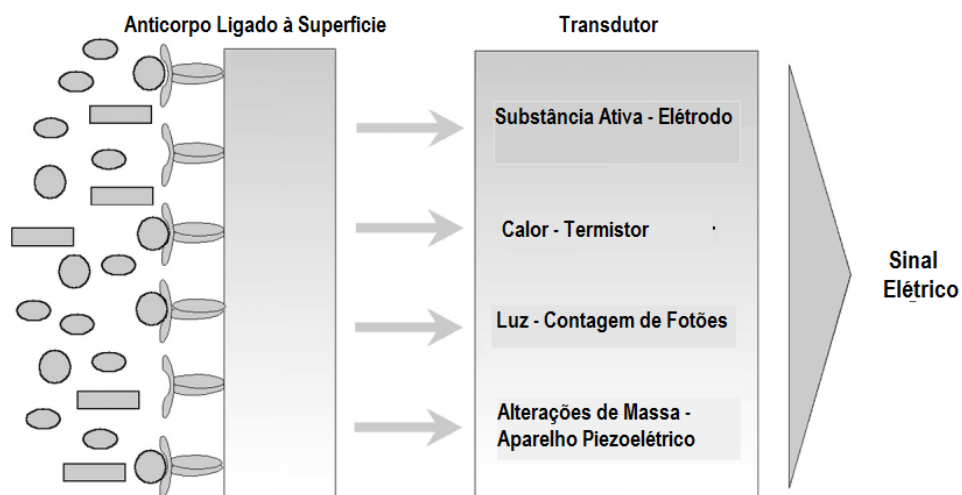


Figura:1.2 - Esquema representativo da constituição de um imunossensor [1].

1.3.4. Ensaios imunológicos

Os ensaios imunológicos, ou imunoenaios, têm sido utilizados ao longo das últimas cinco décadas para quantificar biomoléculas, anticorpos específicos e proteínas, entre outros, como por exemplo IgG, IgM e a Hemoglobina [32]. Os imunoenaios dizem-se heterogêneos quando o anticorpo ou o antígeno é imobilizado num substrato sólido (como por exemplo, microplaca), e homogêneo se o ensaio é realizado diretamente em solução [33].

O desenho do ensaio poderá ser aplicado para um vasto número de analitos em matrizes complexas, devido à elevada seletividade da ligação antígeno-anticorpo e dos numerosos rótulos (por exemplo, NP, NC, enzimas) eficazes que existem na atualidade. Existem vários formatos de imunoenaios que são utilizados para a deteção e identificação de microrganismos, tais como, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, ELISA (*do inglês Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, piezoelétrico ou de massa, ótico, e os imunoenaios eletroquímicos. Dentro dos formatos mencionados, o método ELISA é o mais promissor e utilizado, servindo também de base para o desenvolvimento de muitos imunossensores.

1.3.4.1. ELISA

O método ELISA combina a especificidade dos anticorpos com a sensibilidade dos ensaios enzimáticos, acoplando para tal uma enzima facilmente ensaiada a anticorpos ou a antígenos. Existem duas variantes do método ELISA: o método onde a presença de antígenos é reconhecida pelo anticorpo ou pode ser utilizado para

testar anticorpos previamente reconhecidos pelo antígeno [20]. Existem três formatos de ensaios para cada uma destas variantes, baseados na estrutura de ligação do anticorpo com o antígeno: o método direto, indireto e em sandwich ou ensaio de captura (*Figura 1.3*). Este tipo de ensaios é normalmente do tipo não-competitivo, ou seja o anticorpo reage proporcionalmente com a quantidade do analito da amostra em estudo [34]. O método de detecção direto utiliza um anticorpo primário marcado, isto é ligado a uma enzima, que reage diretamente com o antígeno; o antígeno pode ser imobilizado diretamente na placa de ensaio ou com o formato de um ensaio de captura [2]. O método indireto é o mais utilizado, em que um anticorpo secundário é marcado com especificidade para o anticorpo primário. Nos ensaios de captura é fundamental assegurar a especificidade com o anticorpo primário e não com o anticorpo de captura [2, 20].

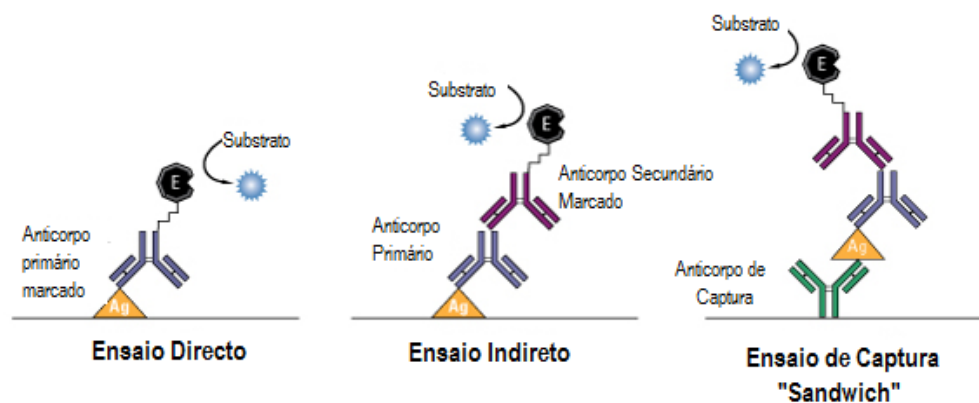


Figura:1.3 - Formatos de ensaios imunológicos: ensaio direto, indireto e de captura "Sandwich" para a variante Antígeno (Ag) [2].

Com base em trabalhos mais recentes [33], num imunoenensaio do tipo competitivo, em que existe competição entre a substância presente na amostra com alguma substância geradora de sinal, por uma quantidade limitada de anticorpos específicos, o sinal detetável é diminuído com o aumento das concentrações do analito. Em contraste os imunoenaios com um formato de sandwich (geralmente não-competitivos) provocam um aumento do sinal detetável à medida que as concentrações do analito em estudo aumentam, sendo este tipo de formato preferível para detecção de pequenas concentrações.

Embora o método ELISA seja mais rápido do que os métodos de cultura convencionais, ainda necessita da etapa de enriquecimento das amostras, que consiste na incubação de amostras de antigénios em meios não seletivos, por forma a favorecer a recuperação de organismos debilitados ou danificados antes da sua inoculação em meios seletivos (solução de amostra), demorando cerca de 3 h para efetuar um ensaio [8].

1.3.5. Transdutores

1.3.5.1. Transdutores de Massa ou Piezoelétricos

A deteção dos imunoenaios, e dos imunossensores de massa ou piezoelétricos baseiam-se na corrente elétrica gerada por certos cristais, quando sujeitos a pressões mecânicas [35]. Esta corrente resulta de alterações na frequência de ressonância do cristal que incorpora o sensor, devido a alterações de massa na amostra ou, à superfície do transdutor [20]. A relação existente entre a massa e a frequência de ressonância (ΔF , Hz) é dada pela equação de Sauerbrey (*Equação 1.1*), onde F_0 é a frequência de ressonância do cristal expressa em MHz, Δm a massa depositada, expressa em gramas e A a área recoberta expressa em cm^2 .

$$\Delta F = \frac{-2,3 \times 10^6 F_0^2 \Delta m}{A} \quad (1.1)$$

1.3.5.2. Transdutores Óticos

Os imunoenaios e imunossensores óticos combinam a capacidade de interação anticorpo-antigénio com medições óticas e são um dos métodos de transdução mais populares na bio-análise [7, 36], devido à possibilidade de aplicação de radiação ultra-violeta visível e devido à rápida geração e leitura do sinal gerado [33]. Estes imunoenaios baseiam-se na medição de sinais luminescentes, eletroquimioluminescentes, fluorescentes, ou outros, resultantes da interação dos microrganismos com os analitos de interesse na amostra. Posteriormente o sinal ótico observado é correlacionado com a concentração dos componentes alvo que se pretendem quantificar [20, 33].

1.3.5.3. Transdutores eletroquímicos

Os imunoenaios eletroquímicos com o formato em sanduíche podem ser classificados como amperométricos, voltamétricos, impedimétricos, condutimétricos e potenciométricos. Esta classificação também é aplicada aos biossensores eletroquímicos, de acordo com o método de transdução que utilizam, como será descrito posteriormente [33]. Na *Tabela 1.2* apresentam-se algumas aplicações destes detetores à análise de microrganismos. Os métodos de transdução mais frequentes são os voltamétricos e todos apresentam baixos limites de detecção para microrganismos, tais como a *Salmonella* e a *Escherichia coli*.

Tabela:1.2 - Método eletroquímicos para detecção de microrganismos.

Método de Transdução	Microrganismo	Limite de Detecção (CFU /mL)	Referência
Amperometria	<i>Escherichia coli</i>	$4,12 \times 10^2$	[37]
	<i>Salmonella typhimurium</i>	10^3	[7, 38]
Voltametria	<i>Escherichia coli</i>	0,3	[39]
	<i>Salmonella typhimurium</i>	98,9	[40]
	<i>Salmonella typhimurium</i>	143	[21]
Impedimetria	<i>Salmonella. spp</i>	$1,0 \times 10^2$	[41]
	<i>Salmonella. typhimurium</i>	$5,0 \times 10^2$	[42]
Potenciometria	<i>Escherichia coli</i>	10	[43]

A amperometria é uma técnica que se baseia na aplicação de potenciais entre o elétrodo indicador e o elétrodo de referência, e medição da corrente gerada devido à redução ou oxidação de um produto metabólico eletroativo e que está correlacionada com a concentração dos analitos “alvo” existentes na solução da amostra [1].

A voltametria é uma técnica em que é medida e registada a corrente em função do potencial aplicado. O potencial onde ocorre o pico de corrente está relacionado com o analito específico e o pico da densidade de corrente é proporcional à concentração das espécies correspondentes. Uma vantagem da voltametria é o baixo ruído, que poderá dotar o sensor com uma alta sensibilidade e permite a detecção simultânea de múltiplos analitos [1, 24].

A impedimetria associada aos imunossensores, deteta alterações no campo elétrico devido à ligação do antigénio ao anticorpo, que são desencadeadas pela alteração da condutância ou da capacitância elétrica na superfície do eletrodo [44, 45].

A condutimetria é uma técnica na qual se mede a alteração da condutância na solução, a uma potencial constante, resultante da produção ou consumo de espécies iónicas, como sucede em certas atividades metabólicas de microrganismos [24]. Esta técnica permite miniaturização, tem uma resposta rápida, sensível, mas de baixa seletividade [24]. A sensibilidade deste tipo de medições é usualmente prejudicada pela condutância da matriz da amostra. Para reduzir este facto, são muitas vezes realizadas medições diferenciais, como por exemplo, através de um sensor com enzima agregada, e com um sensor idêntico sem enzima.

As medições potenciométricas envolvem a medição da diferença de potencial, entre um eletrodo de referência e um eletrodo indicador, a uma corrente quase nula. Existem vários tipos de sensores potenciométricos, mas os Eletrodos Seletivos de Iões (ESI) são os mais utilizados. Este tipo de transdutor é constituído por membranas de permeabilidade seletiva e sensível a espécies iónicas consumidas ou geradas num processo biológico [1, 9, 46].

A impedimetria, a condutimetria e a potenciometria, são métodos de transdução que normalmente são utilizados em imunossensores e imunoensaios eletroquímicos sem marcadores. Existem alguns estudos onde são utilizados nanomarcadores para amplificação do sinal, com os métodos de transdução potenciométricos ou impedimétricos [33].

1.4. Eletrodos Seletivos de Iões

A história dos ESI remonta a 1906, quando Max Cremer descobriu os tubos de vidro sensíveis ao pH, que posteriormente deu origem ao primeiro eletrodo de vidro (membrana não-cristalina) comercial em 1930. Por forma a aumentar o número de iões com possibilidade de reconhecimento, em 1960 foram usados compostos cristalinos, tais como o LaF_3 na composição do sensor. Estes eletrodos de membrana cristalina apresentam uma baixa condutividade iónica para a maioria dos compostos cristalinos e as suas aplicações são limitadas. Na grande maioria das análises potenciométricas há desenvolvimento de ESI de membrana contendo ionóforos ou transportadores de iões [3]. Os ionóforos são compostos neutros ou carregados que

aumentam a permeabilidade da membrana a certos iões, tornando-a seletiva a esses iões. São pequenas moléculas orgânicas que são dissolvidas em agentes plastificantes e incorporadas em polímeros por forma a obter uma membrana com resposta potenciométrica seletiva a determinado ião, designado por ião principal [31]. Neste tipo de elétrodos a escolha da composição da membrana é a componente chave das características de resposta do método potenciométrico, pois é a membrana que vai estabelecer a preferência de resposta, isto é, a seletividade a um determinado analito, na presença de vários iões presentes na amostra (*Figura 1.4*) [1, 4, 46]. Quando os iões penetram a barreira existente entre as duas fases é gerado um potencial até ser alcançado o equilíbrio eletroquímico, que é quando a transferência de iões da membrana para a amostra é igual ao número de iões que são transferidos em sentido contrário [3, 4].

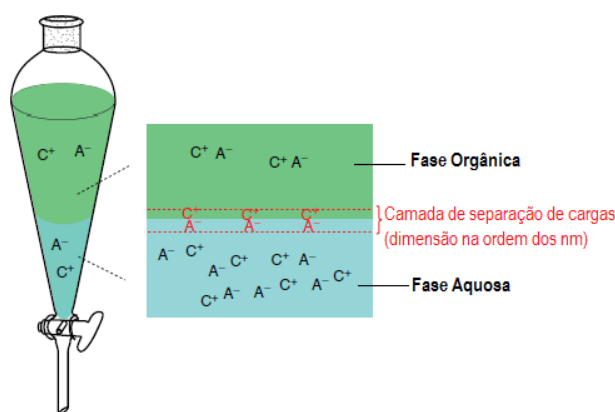


Figura:1.4 - Distribuição de catiões de C^+ e aniões de A^- entre uma fase aquosa (que representa a solução amostra) e uma fase orgânica imiscível (que representa a membrana) [3].

Em potenciometria utiliza-se um eléctrodo indicador, o ESI e um eléctrodo de referência (*Figura 1.5*), de modo a medir a força eletromotriz, isto é a diferença de potencial entre os dois eléctrodos, resultante do potencial entre as duas fases e dos potenciais de junção gerados nas interfaces da célula eletroquímica e a solução de amostra [3, 4]. O potencial produzido entre as duas fases para o ião principal (X) é dependente da atividade desse ião nas duas fases e é descrita em casos ideais pela equação de *Nernst* (*Equação 1.2*) [4].

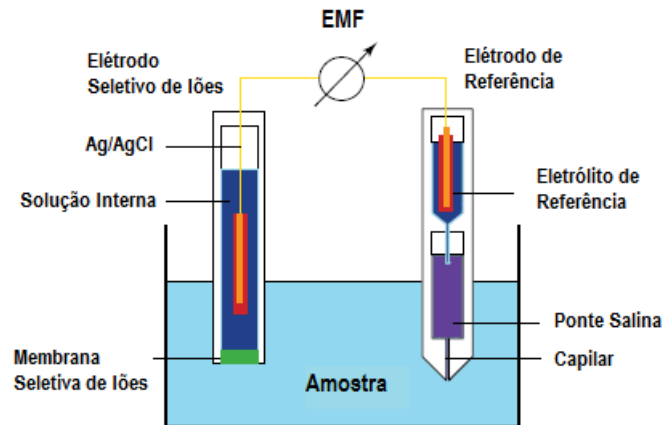


Figura:1.5 - Esquema de uma célula potenciométrica.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} 2,303 \log \frac{a_{x,solução}}{a_{x,membrana}} \quad (1.2)$$

em que, $a_{x,solução}$ e $a_{x,membrana}$ representam a atividade do íon X presente na solução amostra e na membrana, respectivamente, R é a constante dos gases ($R = 8,315 \text{ J/K.mol}$), T a temperatura (Kelvin), n a carga iônica do íon X e F é a constante de Faraday ($96485,3 \text{ C/mol}$). A equação de *Nernst* só pode ser aplicada nos casos em que a especificidade da membrana é infinita ou quando os íons interferentes se encontram em concentrações baixas de modo a que não cause interferências na medição, de modo a que as diferenças de potenciais existentes nas várias interfaces da célula eletroquímica sejam contantes ou negligenciáveis [1, 9, 31]. Se a atividade do íon principal na membrana ($a_{x,membrana}$) for constante, a atividade iônica presente na solução amostra ($a_{x,solução}$) pode ser correlacionada com o potencial medido através da *Equação 1.3*:

$$E = \text{constante} + \frac{59,16}{n} \log a_{x,solução} \quad (\text{mV}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C}) \quad (1.3)$$

Em amostras reais, outros íons que não o íon principal, podem contribuir para o potencial de membrana. Nestes casos a equação de *Nernst* não pode ser aplicada mas pode ser usada a equação de *Nikolsky – Eisenman* (*Equação 1.4*), que considera o contributo do íon principal (X) e, dos íons interferentes (Y). Na prática esta equação

não é usada habitualmente para a quantificação do ião principal na presença dos iões interferentes.

$$E = \text{constante} + \log [a_{X,\text{solução}} + K_{X,Y}^{\text{pot}} \cdot a_Y^{n/y}] \quad (1.4)$$

A técnica de potenciometria com ESI é bastante apropriada para análise de amostras com volumes muito pequenos, pois a resposta potenciométrica é, independente do volume da amostra e da superfície da membrana do eléctrodo. Os ESI têm uma elevada facilidade de miniaturização, podendo ser manufacturados microeléctrodos em massa e a baixo custo. Microeléctrodos seletivos para iões de prata e cádmio têm sido utilizados para a deteção de proteínas em concentrações nanomolares ou inferiores, em células individuais com volumes da ordem de 1 pL [5, 47]. Devido às características apresentadas, cada vez mais são utilizados microeléctrodos seletivos de iões em ensaios potenciométricos [3].

1.4.1. Caracterização de um ESI

Para caracterizar a resposta potenciométrica de ESI [4, 31] é traçada a curva de calibração, em soluções com a força iónica ajustada e constante. Posteriormente é determinada a gama de resposta linear e calculada a equação da reta da diferença de potencial (mV) em função do logaritmo da concentração do ião principal e o limite de deteção instrumental. Para avaliar o desempenho do eléctrodo indicador também é importante o estudo da capacidade de seleção do ião de interesse relativamente a iões interferentes assim como o tempo de resposta, a reprodutibilidade, e o tempo de vida operacional do eléctrodo.

O limite de deteção é definido pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como o valor da atividade correspondente à intersecção das duas retas representativas das partes lineares da curva de calibração do ESI (*Figura 1.6*). O limite de deteção é afetado pela presença de espécies interferentes [4]. Na *Figura 1.6* ilustra-se uma curva de calibração de um catião monovalente na presença de interferências provocadas por catiões, que normalmente desviam o limite de deteção para valores de atividade mais elevados.

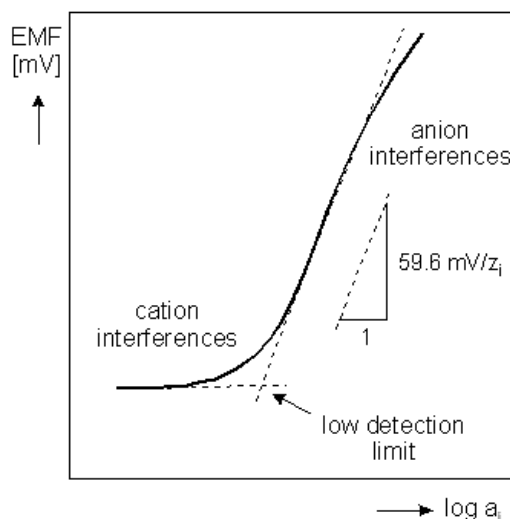


Figura:1.6 - Curva de calibração típica de um ESI [4].

A gama de resposta linear e os limites de deteção dependem da composição da membrana, da configuração do eléctrodo e das condições operacionais [31]. Os sensores mais recentes já permitem a deteção de analitos em concentrações muito baixas (nanomolares ou sub nanomolares).

De acordo com a IUPAC o tempo de resposta de um eléctrodo é o tempo necessário para que seja atingido 90% do valor de potencial representativo de uma resposta estável a cada nova adição do analito em estudo, durante o processo de calibração [4, 31, 48]. A repetibilidade é a variação ou dispersão das medições quando realizadas de forma consecutiva, com os mesmos materiais e condições. A reprodutibilidade é uma medida da dispersão ou de uma série de observações ou resultados realizados ao longo de um período de tempo.

A seletividade é expressa pelos coeficientes de seletividade potenciométrica ($\log K_{X,Y}^{pot}$) e, define a habilidade de um ESI em distinguir o ião principal (para o qual seletividade está a ser estudada) dos restantes iões presentes na solução amostra. Quanto maior o valor de $\log K_{X,Y}^{pot}$, maior será a preferência dos eléctrodos para o ião principal (X) [49]. Existem vários métodos para avaliação da seletividade de um eléctrodo, que dependem do objetivo do estudo [50], sendo os mais comuns os métodos das soluções separadas e o método das interferências fixas.

No método de interferência fixa para a determinação dos coeficientes de seletividade, é medida a força eletromotriz em soluções com atividades constantes no

ião interferente e atividade variável do ião primário e, traça-se o gráfico da força eletromotriz em função do logaritmo da atividade do ião primário A (a_X). A intersecção das zonas lineares do gráfico obtido, indicam o valor de a_X utilizado na equação modificada de *Nikolsky-Eisenman*:

$$K_{x,y}^{pot} = \frac{a_X}{a_Y^{n/y}} \quad (1.5)$$

No método de soluções separadas a força eletromotriz é medida com duas soluções separadas, uma contendo apenas o ião principal X, com a atividade a_X e, a outra solução contém apenas o ião interferente, com a mesma atividade do ião X ($a_X = a_Y$). Se os valores da medição potenciométrica forem E_X e E_Y , respetivamente, o valor do $\log K_{x,y}^{pot}$ é dado pela seguinte equação (*Equação 1.6*).

$$\text{Log } K_{x,y}^{pot} = \frac{(E_Y - E_X)nF}{2,303RT} + \left(1 - \frac{Z_X}{Z_Y}\right) \log a_X \quad (1.6)$$

Este método tem outra variante, em que a atividade do ião Y vai ser incrementada até alcançar a mesma forma eletromotriz obtida pela solução a_X do ião primário, o valor do coeficiente de seletividade será então calculado através da *Equação 1.5*.

O método de interferência fixa e o método de soluções separadas apenas é recomendado em ESI que exibam uma resposta nernstiniana, tanto para o ião principal como para os iões interferentes. Contudo, o método de interferência fixa pode ser utilizado em qualquer ESI para determinar o nível de concentração mínimo do ião primário ao qual o efeito da interferência pode ser negligenciado. Este método é mais fácil de quantificar em relação método das soluções separadas, contudo, é um método representativo da gama de concentrações estudada [31].

1.5.Nano-partículas em Imunoensaios Eletroquímicos

O desenvolvimento de técnicas para detecção de patogênicos alimentares tem sido objeto de muitos estudos na comunidade científica, mas existem ainda muitas abordagens passíveis de implementação, com o intuito de aumentar a rapidez, simplicidade e versatilidade, dos sistemas de detecção mais inovadores, tais como os biossensores para detecção microbiana [21, 51].

Nos últimos anos, a sensibilidade dos sistemas de detecção tem sido melhorada através da introdução de nanomateriais tais como as nano-partículas magnéticas, nanotubos de carbono, pontos quânticos (QD, do inglês *Quantum Dots*), nanocristais (NC), entre outros. Muitos nanomateriais têm elevadas capacidades de condução elétrica que, quando são conjugados com biossensores eletroquímicos (como marcadores ou modificadores), permitem desenvolver métodos com limites de detecção muito baixos resultante do aumento da sensibilidade [51].

As NPM exibem superparamagnetismo quando sujeitos a um campo magnético, mas não permanecem magnetizadas depois da sua ação. Esta propriedade conjugada com o pequeno tamanho das partículas, faz com possam ser transportadas através de um campo magnético, para diferentes locais, sendo apelativas e úteis em muitas aplicações bioquímicas e biomédicas [52]. Adicionalmente uso de NPM tem uma vasta aplicação em ensaios bioquímicos, nas etapas de separação e pré-concentração. O uso das NPM em ensaios biológicos é possível devido à sua estrutura e à cápsula (por exemplo, polimérica, de ouro ou orgânica) com que se encontram revestidas, conferindo-lhes estabilidade e compatibilidade com as biomoléculas. O revestimento de ouro é bastante eficaz na amplificação da estabilidade e biocompatibilidade das NPM, sem diminuir ou interferir com as suas propriedades magnéticas [53, 54].

As NPM mais usadas em ensaios biológicos são de ferro, pois apresentam elevada estabilidade e biocompatibilidade; dimensões reduzidas (< 27 nm), que podem ser comparadas às das proteínas, genes, bactérias ou vírus [52]. Contudo, as partículas de ferro puras são quimicamente instáveis no ar e facilmente oxidadas, sendo muitas vezes necessário, como referido anteriormente, efetuar o revestimento com uma camada inerte composta por óxidos metálicos e metais nobres [52, 53]. Neste trabalho vão ser utilizadas NPM de ferro revestidas com ouro (Fe@Au).

Apesar das NPM já terem uma aplicação abrangente nos ensaios imunológicos e nos imunossensores, nos casos de utilização de nanomateriais como marcadores

biológicos, os QD são os mais utilizados, pois conjugam as vantagens da utilização de nanopartículas com propriedades luminescentes e eletroquímicas únicas, adaptáveis através de variações na composição e tamanho dos QD [53].

Dentro de todos os nanomateriais apresentados anteriormente, as NPM têm tido uma maior atenção pela comunidade científica, no desenvolvimento de aplicações analíticas e ensaios imunológicos [45, 53, 55] e no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos [21, 42, 51, 56], pois proporcionam uma maior amplificação do sinal eletroquímico, quando comparados com os marcadores convencionais (íões metálicos, marcadores enzimáticos) [57].

A aplicação dos nanomateriais em ensaios imunológicos com deteção eletroquímica pode ser classificada em duas categorias de acordo com as suas funções. Podem ser utilizados para modificação do transdutor eletroquímico, melhorando as suas propriedades eletroquímicas (ex. diminuição do ruído da corrente, aumento da razão sinal ruído) ou facilitando a imobilização do anticorpo ou bio-material na sua superfície. Na segunda categoria inserem-se os nanomateriais que são utilizados como marcadores em conjugados biológicos, comuns nos ensaios ELISA em sanduíche [53]. Neste trabalho o anticorpo secundário foi marcado com nanocristais de CdS (NC-CdS), que são bastante estáveis e fácil a transformação em Cd^{2+} livre, permitindo a quantificação do fenómeno de ligação anticorpo secundário e antigénio por parte de ESI.

1.6. Objetivos

O objetivo deste projeto consistiu em desenvolver imunoensaios, com elevada sensibilidade, seletividade e especificidade, de execução rápida, simples e económica, para análise e deteção de *Salmonellas*. Os métodos eletroquímicos (potenciométricos e voltamétricos) apresentam grandes vantagens e conseguem satisfazer estes requisitos podendo ser associados a dispositivos miniaturizados que usem pequenos volumes de amostra (da ordem dos microlitros) e microelétrodos sensíveis a marcadores imobilizados em anticorpos com alta especificidade para os microrganismos alvo.

Para atingir estes objetivos, foram planeados três objetivos específicos:

(i) Desenvolver microelétrodos para a detecção eletroquímica de íons de Cd^{2+} , (provenientes da dissolução dos nanocristais de CdS), de baixo custo e fácil utilização, com características otimizadas [1].

(ii) Desenvolver ensaios imunológicos, preferencialmente num formato não-competitivo de elevada especificidade para a *Salmonella* [3].

(ii) Aplicação dos métodos desenvolvidos a amostras alimentares, tal como o leite, utilizado neste projeto.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e Soluções

No desenvolvimento do trabalho foi utilizada água desionizada (resistividade > 5 MΩ.cm), obtida no sistema Elix Advance da Millipore, exceto nos ensaios para detecção potenciométrica das *Salmonellas*, em que as soluções foram preparadas com água ultrapura, com resistividade de 18,2 MΩ.cm, obtida a partir do sistema de purificação *Simplicity 185* da Millipore.

Foram utilizados os reagentes de qualidade *pro analyse* (p.a.) ou equivalente. Da Fluka usou-se: 2-nitrofeniloctiléter (NPOE), Ionóforo I para cádmio (N,N,N',N'-tetraetil-3,6-dioxaoctanedi(tioamida) ETH 1062, C₂₂H₄₄N₂O₂S₂; *Figura 2.1.A*), Ionóforo X para Sódio (ester tetraetil do ácido 4-terc-butilcalix[4]arene; C₆₀H₈₀O₁₂; *Figura 2.1.B*), tetraquis-p-clorofenilborato de potássio (TCPB), o cloreto de polivinilo (PVC) e o nitrato de cádmio (II) tetrahidratado (Cd(NO₃)₂·4H₂O). O ácido nítrico (HNO₃) a 65% (v/v) foi fornecido pela Aldrich. O nitrato de sódio (NaNO₃), o cloreto de potássio (KCl), o hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄), o dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄), era da Riedel-de Haën; o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 30% (v/v), o etanol (C₂H₆O), o hidróxido de sódio (NaOH) e o cloreto de sódio (NaCl) eram da Panreac. O ácido clorídrico (HCl) 36,5-38% (v/v) era da Basic Scharlau e o Tetraidrofurano (THF) era da Merck.

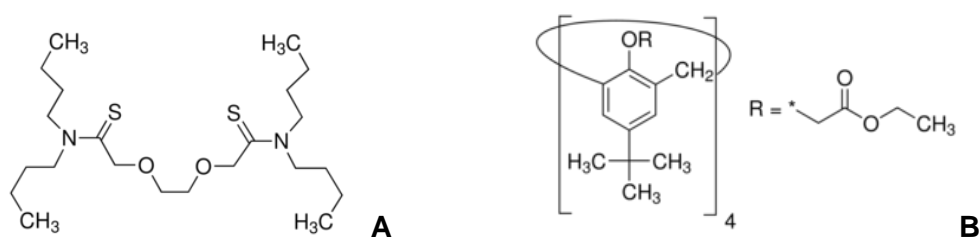


Figura:2.1 - Fórmulas químicas dos ionóforos de cádmio (A) e de sódio (B).

O ajuste de pH das soluções foi obtido por adição de ácido clorídrico 0,1 mol/L ou de hidróxido de sódio 0,01 mol/L.

A solução tampão de fosfato 0,1 mol/L (PBS, do inglês *phosphate buffer solution*) foi preparada por adição de 3,8 mL de Na₂HPO₄ e de 46,2 mL NaH₂PO₄, a 50 mL de água desionizada.

A suspensão mãe de *Salmonellas* com concentração 5 ×10⁹ células/mL, a suspensão de anticorpo imobilizado em Fe@Au (Ab-Fe@Au), suspensão de NC de CdS (NC) e a suspensão de anticorpo secundário marcado com NC (NC-Ab) a utilizadas nos ensaios imunológicos foram preparadas num projeto anterior [7, 38]. A concentração do anticorpo secundário na suspensão NC-Ab era de 1,25 µg/mL.

2.2. Materiais e Equipamentos

As medições eletroquímicas de diferença de potencial foram realizadas com dois potenciômetros da marca Metrohm, ambos modelo 780 (*Figura 2.2*) e um agitador magnético da Crison Instruments modelo microST2038 foi usado para agitação das soluções. Foi utilizado um elétrodo de pH combinado referência CWL/S7, da marca Sentek. Um elétrodo de referência de dupla junção comercial (Orion 90-02-00) foi utilizado para a caracterização inicial dos elétrodos construídos, em que o volume da solução era 25 ou 100 mL.



Figura:2.2 - Medidor de pH, Metrohm 780.

Na anodização dos fios de prata, foi utilizada uma fonte de Alimentação ISO-TECH IPS-2303 (*Figura 2.3 - A*), um amperímetro FLUKE, modelo 8808A 5-1/2; uma resistência de fluxo variável; uma matriz de contato (*Figura 2.3 - B*); um contra-elétrodo de platina; cabos de ligação e um agitador o magnético da marca Crison Instruments.

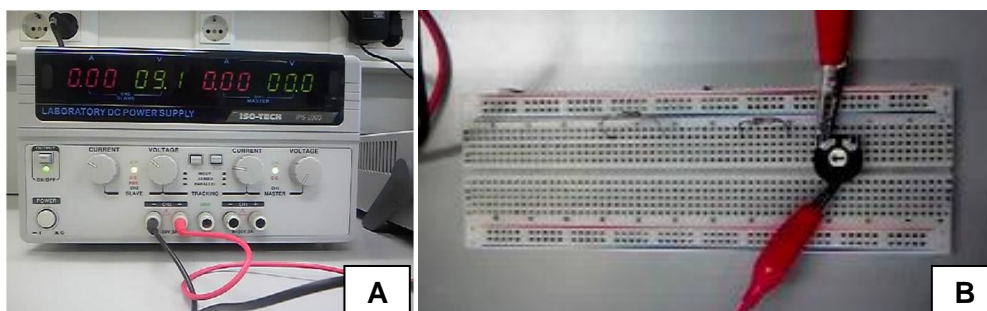


Figura:2.3 - Fonte de alimentação ISO-TECH (A) e, matriz de contato e resistência variável (B).

2.3. Construção dos Eléttodos

2.3.1. Eléttodos de Ag/AgCl

Para a construção dos eléttodos de referência de Ag/AgCl, foram cortadas porções de cerca de 4 cm de fio de prata, com 1 mm de diâmetro (ref^a AG005160 da Goodfellow). Os fios de prata foram polidos, com uma lixa fina, nas superfícies limítrofes aos pontos de corte e posteriormente foram mergulhados numa solução de HNO₃ de 0,1 mol/L, para remoção das impurezas presentes à superfície. De seguida, foi montado um circuito em série numa placa de montagem elétrica seguindo o esquema apresentado na *Figura 2.4*. O fio de prata foi ligado ao polo positivo do circuito elétrico (*Figura 2.4*), e o contra-eléttodo de platina no polo negativo. Os eléttodos foram imersos numa solução de KCl 3 mol/L e, aplicou-se uma voltagem de 9,6 V, sendo a intensidade de corrente da ordem dos 100 μ A, obtida com uma resistência variável (0,832 K Ω) ao circuito elétrico (*Figura 2.3*). Ao fim de duas horas, já era notória a presença de cloreto de prata depositado no fio de prata (coloração acinzentada), mas a eletrólise foi prolongada até se verificar um revestimento uniforme e homogéneo (cerca de quatro horas), como se pode observar na *Figura 2.5*. Não foi visível a presença de bolhas efervescentes, na superfície do contra-eléttodo, comuns

aos procedimentos de anodização, provavelmente por ter sido um processo lento, realizado com recurso a uma intensidade de corrente baixa.

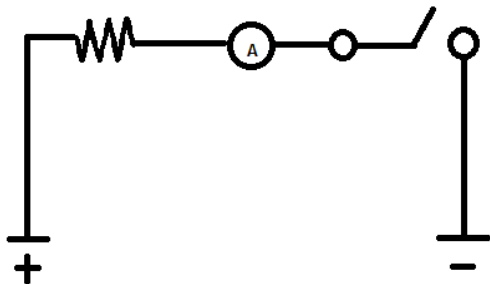


Figura:2.4 - Esquema do circuito em série construído para a anodização do fio de prata.



Figura:2.5 - Fio de Ag recoberto com AgCl (referência Ag/AgCl).

Os elétrodos de Ag/AgCl foram aplicados como referência interna nos microelétrodos de cádmio (ESI-Cd) e de sódio (ESI-Na).

Também foram utilizados como elétrodos de referência (ER-Ag) em determinações potenciométricas, em que o fio de prata foi introduzido numa ponta de pipeta de 200 μL , previamente lavada com THF (duas vezes consecutivas). Nestas pontas foi colocado papel de filtro embebido em KCl 3 mol/L na extremidade, de modo a permitir a troca iónica e reter o eletrólito, uma solução de KCl 10^{-3} ou 3 mol/L. Todos os elétrodos preparados em pontas de micropipetas foram

Os elétrodo de Ag/AgCl de dupla junção, foi obtido através de duas pontas de micropipetas; ao elétrodo de referência descrito anteriormente foi inserida uma nova ponta de micropipeta (preenchida com NaNO_3 10^{-3} mol/L), dentro de um ER-Ag e a junção foi fixada com película flexível /parafilme da Brand®).

2.3.2. Microelétrodos

Foram construídos ESI-Cd, para funcionar como sensor de *Salmonella*, e ESI-Na, para serem usados como pseudorreferências, em pontas de pipetas volumétricas de 200 μL , previamente lavadas com THF (duas vezes consecutivas).

As membranas seletivas de iões foram obtidas por dispersão em PVC do ionóforo e aditivo (TCPB), dissolvidos no solvente mediador (THF):

(A) solução do sensor dos ESI-Cd: 1% de Ionóforo I de Cádmio; 0,25% de TCPB; 64,75% de NPOE e 34% de PVC dissolvido em 1 mL de THF [58];

(B) solução do sensor dos ME-Na: 0,70% de Ionóforo X de Sódio; 0,20% de TCPB de Potássio; 66,10% de NPOE e 33% de PVC dissolvido em 1 mL de THF [59].

Para a construção dos ESI-Cd e ESI-Na, as pontas lavadas eram imersas na solução do sensor recém-preparado até que, por ação de capilaridade, a solução preenchesse uma altura constante de 7,5 mm da ponta da pipeta. Posteriormente as pontas ficaram a secar à temperatura ambiente, resguardadas da luz, durante pelo menos 12 horas, até ocorrer a evaporação completa do THF. A posição de secagem foi estudada tendo sido adotada a posição a favor da gravidade (extremidades mais finas voltadas para baixo). Após a secagem, os ESI-Cd foram preenchidos com uma solução aquosa contendo $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-7} mol/L e NaNO_3 10^{-5} mol/L; e depois ficaram a condicionar numa solução de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol/L, durante um tempo mínimo de 48 horas. Os ESI-Na, foram condicionados numa solução de NaNO_3 (10^{-3} mol/L), que também foi utilizada como solução interna do ESI. Para as determinações potenciométricas era introduzido um fio de Ag/AgCl nos ESI e isolava-se a parte superior do elétrodo, como se encontra esquematizado na *Figura 2.6*.

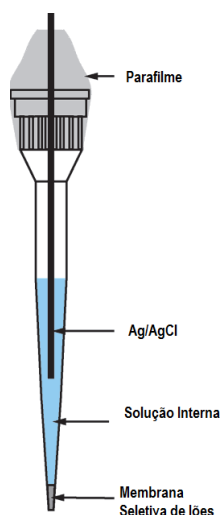


Figura:2.6 - Configuração de um microelétrodo seletivo de íões, construído numa ponta de 200 μL [5].

2.4. Caracterização dos elétrodos

Os elétrodos de cádmio e sódio construídos foram caracterizados de acordo com as regras da IUPAC [49, 50, 60]. Para determinar o limite de deteção (LD) para cada elétrodo foram traçadas três curvas de calibração (gráfico de resposta de cada elétrodo em função do logaritmo da concentração) consecutivas, duas por ordem crescente de concentração e uma por ordem decrescente. Também foram obtidas curvas de calibração, efetuando adições sucessivas de soluções padrão de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a 100 mL de água. A diferença de potencial de cada solução era registada quando alcançava um valor estável $\pm 0,2$ mV/min. Em todas as curvas de calibração foram determinados os seguintes parâmetros: zona de resposta linear, a equação da reta e respetivos coeficientes de correlação e o limite de deteção.

O tempo de vida operacional dos ESI-Cd e a reprodutibilidade da sua resposta ao longo do tempo foram avaliados através dos parâmetros de curvas de calibração. Considerou-se um elétrodo em fim de vida, quando apresentavam declives na resposta linear inferior a 19 mV/década.

A repetibilidade de resposta dos elétrodos foi avaliada para diferentes volumes de amostra. Para o efeito foram efetuadas quinze medições consecutivas em soluções de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L e de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. Com os valores obtidos foi calculado o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV).

O efeito do pH foi estudado por avaliação da alteração na resposta potenciométrica de um eletrodo indicador em soluções de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} mol/L, preparadas em HNO_3 0,01 mol/L. As variações de pH foram obtidas por adição de NaOH 0,01 mol/L. A gama de valores de pH estudada foi de 2 a 12. Para a comparação da resposta obtida numa solução aquosa e numa solução ácida, foram realizadas duas calibrações, segundo o método de adição utilizando uma solução aquosa ou ácida como base. As soluções ácidas utilizadas foram soluções de HNO_3 10^{-3} mol/L e 10^{-4} mol/L.

2.5. Dissolução dos Nanocristais de CdS

A solubilização do NC de CdS, foi estudada potenciometricamente (durante 30 min) com os ESI-Cd e o ER-Ag. As medições foram realizadas em eppendorf's de 1,5 mL, em soluções de 150 μL H_2O_2 (3%, 30% e 50%; v/v), 5 μL PBS (pH = 4,4) e 5 μL da suspensão de NC diluída, após agitação e homogeneização em vortex.

Posteriormente este procedimento foi aplicado a 10 μL da suspensão de NC conjugado com anticorpo secundário (NC-Ab) e 10 μL H_2O_2 a 30% (v/v). Neste estudo foram preparadas suspensões de NC-Ab em PBS com diferentes concentrações em anticorpo secundário (0,00125 a 1,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cada suspensão estudada foi homogeneizada em vortex e ficou em repouso durante uma hora (com exposição à luz natural e à temperatura ambiente); ao fim deste tempo a suspensão resultante foi novamente homogeneizada (em vortex) e mediu-se a diferença de potencial com ESI-Cd e ESI-Na. Foram realizadas 3 réplicas para cada concentração de conjugado NC-Ab.

A lavagem dos eletrodos entre as diferentes concentrações de NC-Ab foi realizada com água desionizada, seguida de condicionamento numa solução de 10^{-3} mol/L de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ e 4×10^{-3} mol/L de NaNO_3 , até estabilização da diferença de potencial.

2.6. Determinação Potenciométrica da *Salmonella typhimurium*

Foram preparadas diferentes soluções de *Salmonella typhimurium* (1×10^1 - 1×10^9 CFU/mL), por diluição sucessiva da solução mãe (5×10^9 células/mL [7]) com PBS. Todas as soluções foram conservadas a 4°C até ao início dos ensaios.

Numa primeira etapa foram adicionados a um eppendorf's de 1,5 mL, 10 µL da suspensão Ab-Fe@Au, previamente diluída 2 vezes em PBS, a um volume de solução de *Salmonella* diluída em PBS, (Figura 2.7 A e B) e deixou-se em repouso após agitação mecânica (em vortex) para homogeneização. Ao fim de 20 minutos, as partículas Ab-Fe@Au conjugadas com as *Salmonellas* foram atraídas e aglomeradas magneticamente, por ação de um magneto, como demonstrado na Figura 2.8, para remoção do sobrenadante, com o auxílio de uma micropipeta volumétrica. Posteriormente procedeu-se a duas lavagens consecutivas dos conjugados biológicos com PBS. As suspensões foram agitadas mecanicamente entre as adições.

De seguida ao conjugado anterior foram adicionados 10 µL NC-Ab, contendo 0,125 µg/mL em anticorpo secundário, Figura 2.7 (C) e repetiu-se o procedimento anterior.

Após os 20 minutos de conjugação e lavagem, com auxílio do magneto, dissolveram-se os NC de CdS com 20 µL de H₂O₂ a 30 % (v/v) Figura 2.7 (D), com agitação mecânica inicial. Ao fim de 20 minutos de repouso, a suspensão resultante foi novamente agitada e mediu-se a diferença de potencial entre ESI-Cd e ESI-Na.

Em paralelo, preparou-se dois ensaios de branco, em que se repetiu todo o procedimento mas a solução de *Salmonella* foi substituída por PBS. O valor medido nesta soluções foi subtraído aos valores obtidos em cada ensaio com *Salmonella*, e traçou-se o gráfico das variações das diferenças de potencial em função da quantidade de *Salmonella* (expressa em CFU/mL). A curva de calibração foi calculada recorrendo ao modelo de quatro parâmetro (modelo 4P) para o ajuste dos pontos experimentais e posterior determinação do limite de deteção. Este modelo, trata-se de um processo iterativo que recorre à regressão não linear, para estimar os quatro parâmetros de uma curva sigmoidal (a-valor máximo da resposta; d-valor mínimo da resposta; k-fator de declive; XL50-ponto de inflexão da sigmoidal). Com estes parâmetros e com o desvio padrão de várias análises ao branco (s) calcula-se o limite de deteção, por aplicação da Equação 2.1 [38]

$$LOD = x \left(\frac{a - d}{(a - d) - 3s} - 1 \right)^{-1/k} \quad (2.1)$$

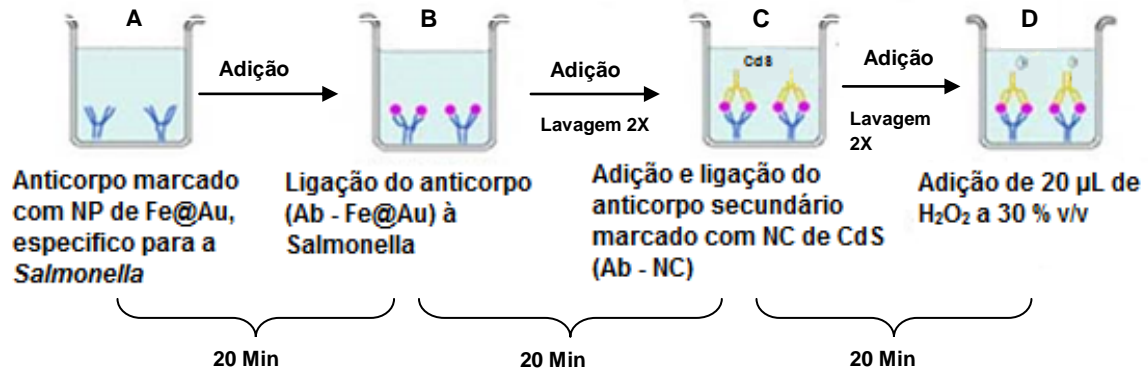


Figura:2.7 - Esquema do ensaio utilizado para a determinação potenciométrica da *Salmonella typhimurium*.



Figura:2.8 - Aglomeração das partículas magnéticas através da ação de um campo magnético.

Para a aplicação do método potenciométrico desenvolvido em amostras reais, foi quantificada a *Salmonella typhimurium* numa amostra de leite bovino comercial, que foi diluída 5 vezes com água ultrapura e contaminada com *Salmonella typhimurium*. Para fortificação da amostra utilizou-se 900 µL de leite diluído e 100 µL das soluções de incubação de *Salmonellas*, com concentrações de $1,00 \times 10^4$ e $1,00 \times 10^3$ CFU/mL, obtendo-se uma concentração final de $1,00 \times 10^3$ e $1,00 \times 10^2$ CFU/mL, respetivamente. Este ensaio seguiu as mesmas etapas do procedimento descrito anteriormente. Todas as amostras foram conservadas a 4°C.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

3.1. Caracterização dos elétrodos

Para que um eletrodo possa ser utilizado como detector potenciométrico, as medições têm de ser concordantes e fiáveis e para tal é necessário avaliar os seus parâmetros de resposta, por forma a otimizar as condições operacionais, adaptando as características dos detetores à análise das amostras. No âmbito deste trabalho foram construídos elétrodos de cádmio e de sódio e foram testadas e otimizadas as condições operacionais, nomeadamente a influência do volume da amostra na resposta do sensor. Os elétrodos de sódio (ESI-Na) construídos foram utilizados como elétrodos de pseudoreferência em estudos realizados com volumes de amostra entre 20 μ L e 100 mL, tendo sido essencialmente garantida a estabilidade e reprodutibilidade da resposta. Os elétrodos de cádmio (ESI-Cd) foram construídos para serem usados na deteção de *Salmonellas* nas amostras. Para esse efeito, otimizou-se a composição da solução interna e a de condicionamento, por avaliação dos parâmetros de resposta: declive, limite de deteção, ordenada na origem, tempo de vida, repetibilidade e reprodutibilidade. Nestes estudos usaram-se como referências um eletrodo de dupla junção comercial, elétrodos de Ag/AgCl e ER-Ag construídos no laboratório e ESI-Na como pseudoreferências, dependendo do volume da solução de amostra. Também foi realizado um estudo do comportamento dos elétrodos (referência e indicador) em amostras com diferente pH.

3.1.1. Microelétrodos de sódio

As membranas dos elétrodos seletivos de iões estudados neste trabalho foram obtidas por dispersão dos ionóforos em PVC e, eventualmente de aditivos para lhes conferir maior estabilidade e seletividade de resposta, dissolvidos num solvente com propriedades de plastificante do PVC. A solução do sensor de Na⁺ utilizado tinha a seguinte composição: 0,70% de Ionóforo X de Sódio; 0,20% de TCPB de Potássio; 66,10% de NPOE e 33% de PVC dissolvido em 1 mL de THF. Esta foi a composição escolhida para a membrana seletiva dos ESI-Na, devido aos bons resultados

reportados por outros autores [59] e, por apresentarem boa estabilidade, uma característica essencial para um eletrodo ser utilizado como referência.

Os ESI-Na construídos foram calibrados usando soluções padrão aquosas de NaNO_3 com diferentes concentrações para avaliar a sua aplicabilidade como pseudoreferência dos ESI-Cd. Estes eletrodos apresentaram uma elevada estabilidade ($\pm 0,2$ mV/min) na resposta. Na *Figura 3.1*, podemos observar uma curva de calibração típica obtida com um eletrodo que tinha sido condicionado durante 3 dias em NaNO_3 1×10^{-3} mol/L. Para este eletrodo foi obtido um declive da resposta de 60,7 mV/década, próximo do valor teórico ou nernstiniano esperado (59,15 mV/década de concentração para um catião com carga igual a um, a uma temperatura constante de 25 °C), para a zona de resposta linear (10^{-4} a 10^{-1} mol/L) e um coeficiente de correlação superior a 0,999.

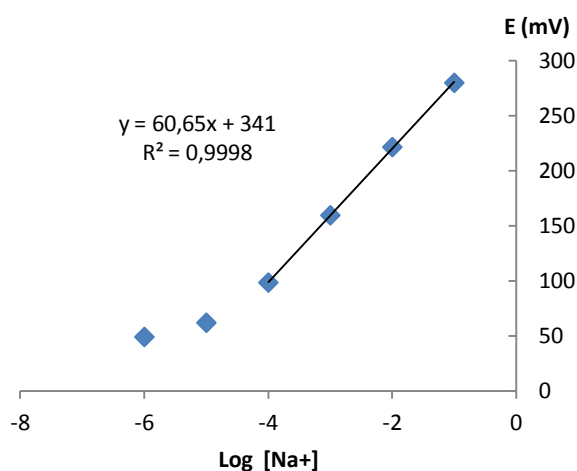


Figura:3.1 - Curva de calibração típica de um microeletrodo de sódio, obtido com soluções padrão de NaNO_3 .

A reprodutibilidade dos ESI-Na, isto é, o grau de concordância entre medições, realizadas nas mesmas condições em locais diferentes por pessoas diferentes [49, 50] foi estudada. Para o efeito, num período de tempo inferior a uma semana, traçaram-se cinco curvas de calibração em cinco dias diferentes, para dois eletrodos (com diferentes referências internas). Nestas experiências foi utilizado sempre o mesmo eletrodo de referência comercial e os ESI-Na foram condicionados em NaNO_3 $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L. Os valores do declive da resposta obtidos (*Figura 3.2*) evidenciam que estes eletrodos apresentaram comportamento reprodutível (declive médio e DP de $54,5 \pm 4,3$ mV/década e $58,3 \pm 3,5$ mV/década, respetivamente para o Na1 e Na2, e

coeficientes de correlação superiores a 0,991). Os potenciais obtidos na ordenada da origem para os dois elétrodos (341 ± 12 mV e 321 ± 21 mV, respetivamente para Na1 e Na2) foram bastante semelhantes e reprodutíveis, tendo em conta que não se controlou o elétrodo de referência interna (os fios de prata tinham revestimentos com espessuras visualmente diferentes). Verificou-se também que o tempo de vida operacional dos elétrodos era de 3 semanas, aproximadamente.

Estes resultados sugeriram que os ESI-Na apresentavam características de resposta adequadas para a sua utilização como elétrodos de referência numa célula potenciométrica. Para se concluir sobre este aspeto foram ainda realizados estudos para comparar a resposta dos ESI-Cd com diferentes referências.

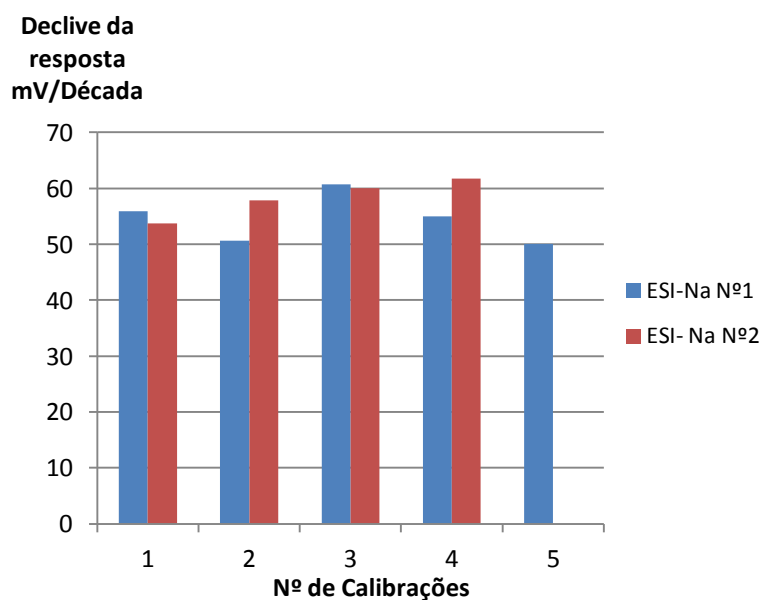


Figura:3.2 - Distribuição dos valores de declive da resposta dos ESI-Na Nº 1 e 2, obtida através de 5 calibrações efetuadas em cinco dias diferentes ao longo duma semana.

3.1.2. Microelétrodos de cádmio

A solução do sensor Cd^{2+} era constituída por 1% de Ionóforo de Cádmio, 0,25% de TCPB, 64,75% de NPOE e 34% de PVC dissolvido em 1 mL de THF. Foi escolhida esta composição para a membrana seletiva dos ESI-Cd, devido aos bons resultados reportados por outros autores na deteção de cádmio. No trabalho publicado por *Wardak* em 2012 [58], foram obtidos declives de resposta na ordem dos 30,6 mV/década, na gama de resposta linear (1×10^{-5} a 1×10^{-1} mol/L) e um limite de deteção

de $2,9 \times 10^{-6}$ mol/L. *Thurer et al*, desenvolveram um imunensaio potenciométrico de proteínas IgG usando Pontos Quânticos de CdS e como marcadores e obtiveram limites de detecção inferiores a 10 fmol em amostras de 150 μ L [61].

O condicionamento de ativação de resposta dos ESI-Cd construídos foi estudado, particularmente a concentração da solução de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ e o tempo necessário para a ativação. Um condicionamento apropriado dos ESI permite a otimização da resposta ao nível do declive e do limite de detecção alcançados, sendo também essencial para o restabelecimento da membrana seletiva de íons após utilização prolongada. Para esse efeito, avaliaram-se curvas de calibração obtidas com ESI-Cd recém construídos e que estiveram a condicionar numa solução de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol/L durante 5 h, 24 h e 48 h; o elétrodo de referência foi sempre o de Ag/AgCl comercial. Os resultados típicos para estes três tempos de condicionamento estão apresentados no gráfico da *Figura 3.3*, e permitem verificar que o tempo mínimo de condicionamento para obtenção de uma resposta aceitável (com base no declive de resposta e no coeficiente de correlação) era de 48 horas. Este foi o tempo mínimo utilizado em todos os resultados apresentados neste projeto.

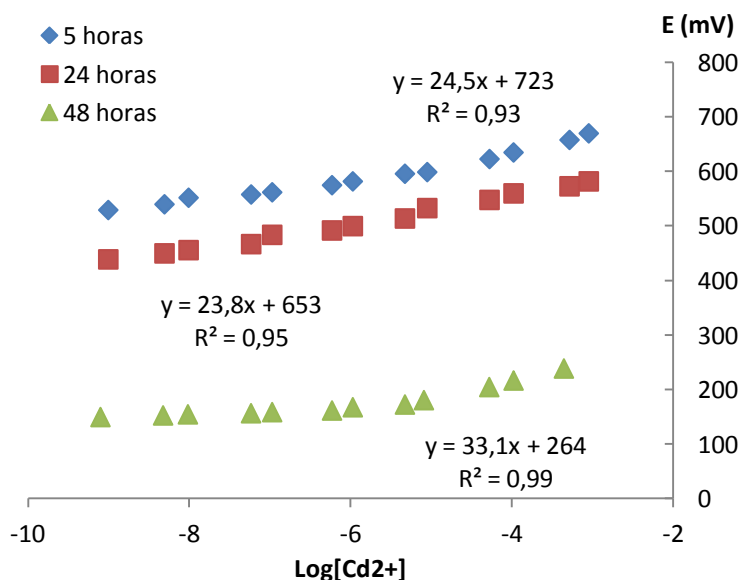


Figura:3.3 - Curvas de calibração obtidas para três ESI-Cd, com diferentes tempos de condicionamento (5, 24 e 48 horas), numa solução de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol/L (elétrodo de referência: Ag/AgCl comercial).

Seguidamente, otimizou-se a concentração da solução de condicionamento, Para tal, selecionaram-se novos elétrodos cujo condicionamento de ativação da resposta foi realizado durante 48 horas em $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol/L (E1), 10^{-3} mol/L (E3) e 10^{-5} mol/L (E4). Na *Figura 3.4* e na *Tabela 3.1.* são apresentados resultados típicos de curvas de calibração, obtidas para a gama de concentração de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ de $1,00 \times 10^{-10}$ mol/L a $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, usando o método das adições múltiplas de solução padrão a 100 mL de água desionizada. Verificou-se que os elétrodos condicionados na solução de concentração mais elevada em cádmio (10^{-2} mol/L), proporcionavam uma resposta mais sensível, quando comparados com os ESI condicionados em soluções de concentração inferior, como se ilustra com o exemplo apresentado, em que o declive de E1 apresentou um valor de 26,6 mV/década, na gama resposta linear (6×10^{-7} a 9×10^{-4} mol/L) próximo do valor teórico ou nernstiniano, isto é, 29,6 mV/década a 25 °C (*Tabela 3.1.*). De referir que estes ESI-Cd têm uma referência interna (um dos fios de Ag/AgCl com espessura não controlada era mergulhado na solução de referência interna), o que justifica o deslocamento da escala de potenciais para diferentes ESI e os diferentes valores das ordenadas na origem. Tendo por base os resultados obtidos, nos ensaios subsequentes, tais como os imunoenaios com *Salmonellas*, os ESI-Cd foram condicionados na solução de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-2} mol/L, durante pelo menos 48 horas.

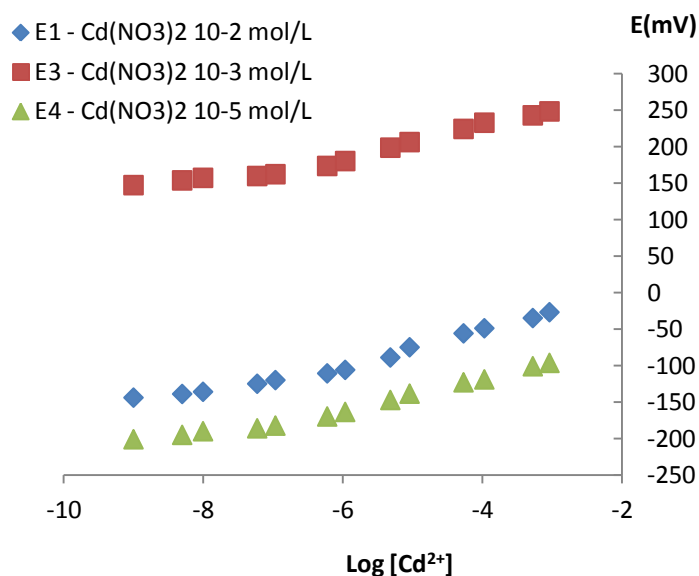


Figura:3.4 - Curvas de calibração dos elétrodos de cádmio E1, E3 e E4, obtidas após 48 horas de condicionamento em diferentes concentrações de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

Tabela:3.1 - Parâmetros da curva de calibração de elétrodos condicionados em diferentes soluções de Cd(NO₃)₂.

	E1	E3	E4
[Cd(NO₃)₂] (mol/L)	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁵
r (n=13)^a	0,997	0,996	0,998
Declive (mV/década)	26,6	23,6	22,5
Ordenada na Origem (mV)	+ 54,9	+ 322,4	- 27,6
Gama de Resposta Linear (mol/L)	6x10 ⁻⁷ - 9x10 ⁻⁴	6x10 ⁻⁷ - 9x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁷ - 9x10 ⁻⁴
LD (mol/L)	3,3x10 ⁻⁸	3,6x10 ⁻⁸	1,9x10 ⁻⁸

n: número de pontos; coeficiente de correlação (r), e limite de detecção (LD).

Posteriormente, efetuaram-se três curvas de calibração para o mesmo ESI-Cd para a determinação do limite de detecção segundo as regras da IUPAC [49, 50, 60]. Foi utilizado o eletrodo Ag/AgCl comercial como referência. No gráfico da *Figura 3.5* estão apresentados os resultados típicos obtidos para um eletrodo com seis dias de condicionamento; as leituras foram realizadas em 50 mL de solução. O declive médio encontrado para as três calibrações deste eletrodo foi aceitável (25,7 mV/década, com um desvio padrão de ± 1,2 mV/década, para o intervalo de concentração de 1x10⁻⁵ a 1x10⁻²), e o coeficiente de correlação das três curvas foi igual ou superior a 0,998. Com este estudo o limite de detecção médio, foi de 3,0x10⁻⁷ ± 2x10⁻⁸ mol/L (Limite de Detecção Médio ± DP). *Wardak* em 2012, utilizando ESI-Cd semelhantes aos desenvolvidos neste trabalho, obteve uma sensibilidade inferior (declive de resposta 30,6 mV/década e um limite de detecção de 2,9 x10⁻⁶ mol/L, para gama linear de 1x10⁻⁵ a 1x10⁻¹ mol/L) [58]; *Thürer et al*, que alcançou um limite de detecção de 1,00 x10⁻¹⁰ mol/L de cádmio, em amostras com um volume de 100 mL (inferior aos limites alcançados neste trabalho) e de 5,6 x10⁻⁸ mol/L de cádmio, com volumes inferiores (150 µL) [5]. Este estudo indicou que os ESI-Cd construídos apresentavam potencialidades como detetores na análise de tomas de amostra da ordem dos microvolumes.

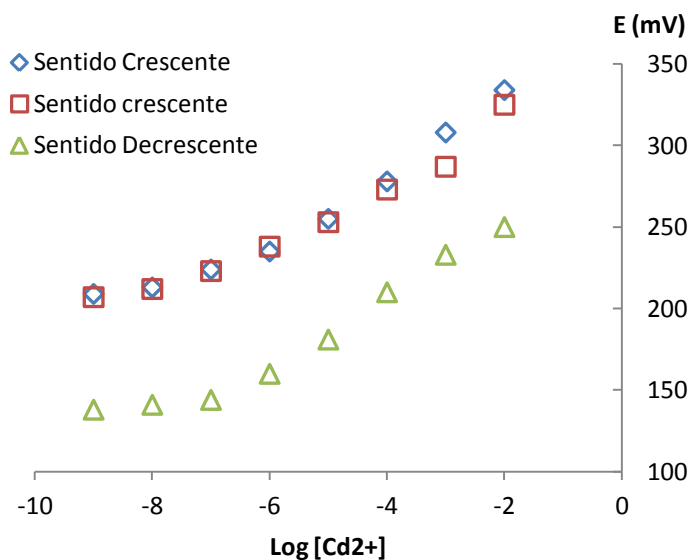


Figura:3.5 - Gráfico representativo de três calibrações consecutivas efetuadas no mesmo dia, para o mesmo eletrodo de cádmio, efetuadas segundo as regras da IUPAC [49]: 2 calibrações ordem crescente, seguidas de 1 calibração ordem decrescente de concentração.

O volume da amostra a utilizar nas análises foi estudado. Observou-se que a resposta, para o mesmo eletrodo foi quase idêntica quando se traçavam curvas de calibração com 100 mL e 1,5 mL de solução, recorrendo a um eletrodo ER-Ag como referência, evidenciando que o volume menor não afetava a resposta do ESI (Figura 3.6).

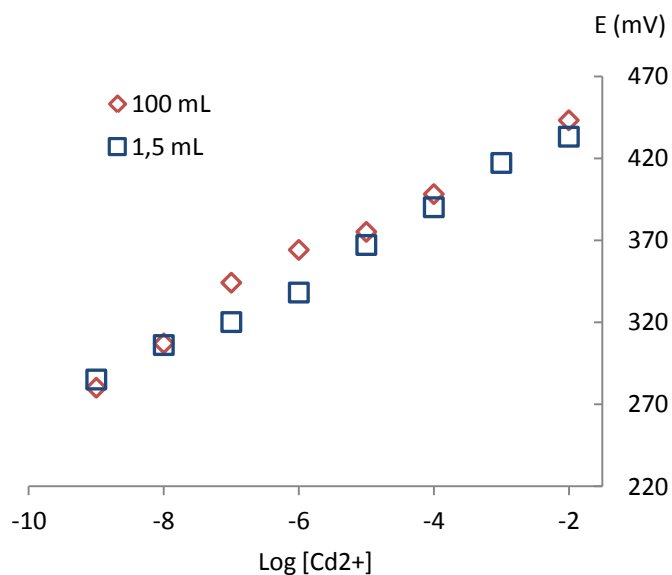


Figura:3.6 - Gráfico representativo de duas calibrações consecutivas, utilizando 100 mL e 1,5 mL de solução padrão, efetuadas com o mesmo eletrodo ESI-Cd e ER-Ag.

Por forma a aumentar as potencialidades do uso da pré-concentração com as nanopartículas magnéticas e deste modo diminuir o limite de deteção do ensaio imunológico, reduziu-se então o volume da solução amostra para 20 μL . Nestas medições potenciométricas em volumes muito pequenos foi sempre utilizada uma pseudoreferência ESI-Na. No gráfico da *Figura 3.7*, apresenta-se uma curva de calibração obtida com um ESI-Cd, que apresentou um comportamento representativo da maioria dos eléctrodos construídos. O declive da resposta linear (10^{-5} a 10^{-3} mol/L) foi de 23,1 mV/década, para um coeficiente de correlação de 0,999; o limite de deteção estimado foi de 4×10^{-6} mol/L de cádmio. Estes resultados permitiram constatar que uma diminuição elevada do volume da amostra teve uma influência relevante no limite de deteção (*Tabela 3.2*). O aumento verificado tem sido reportado por outros autores [61], apesar de aparentemente a resposta de um ESI (declive, LD) ser independente do volume da solução amostra [61].

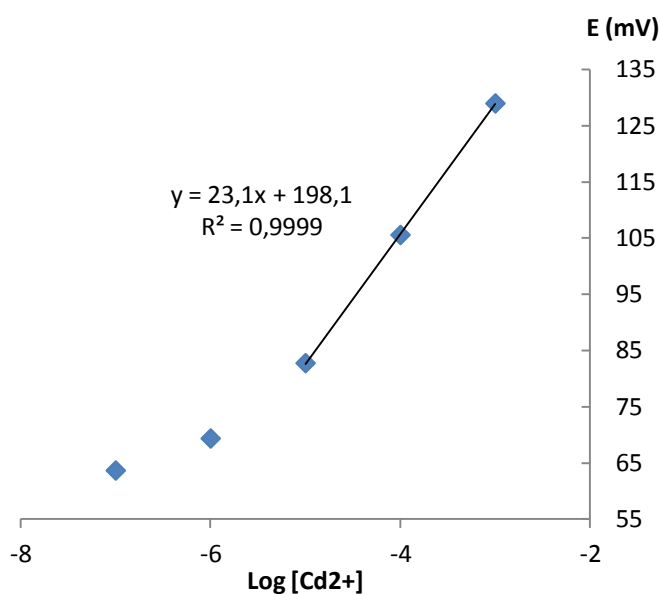


Figura:3.7 - Gráfico representativo duma curva de calibração, utilizando um volume de 20 μL de solução amostra.

Tabela:3.2 - Comparação das características da resposta dos ESI para cádmio, de acordo com o volume da solução amostra.

	Volume Solução		
	20 μ L	1,5 mL	100 mL
Declive (mV/década)	23,1	24,8	23,6
r	0,999	0,986	0,996
Tempo Condicionamento (dias)	2	4	3
LD (mol/L)	$4,4 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-8}$
Referência	ESI-Na	ER-Ag	ER-Ag

A influência do eletrodo de referência, para volumes de amostra de 20 μ L foi estudada. Na *Figura 3.8* mostram-se curvas de calibração obtidas com o mesmo ESI-Cd mas com eletrodos de referência diferentes: um eletrodo de Ag/AgCl de dupla junção, com solução interna de KCl 10^{-3} mol/L e solução externa de NaNO_3 10^{-3} mol/L e um ESI-Na. A sensibilidade da resposta foi semelhante, mas quando se usou o ESI-Na obteve-se um limite de detecção ($2,3 \times 10^{-8}$ mol/L) mais baixo do que com o eletrodo de Ag/AgCl ($1,5 \times 10^{-7}$ mol/L). Nos ensaios realizados com outros ESI-Cd os limites de detecção obtidos com eletrodo de Ag/AgCl alcançaram os valores obtidos com os ESI-Na, mas estes eletrodos apresentavam uma menor robustez mecânica. Com base nos resultados obtidos, nos ensaios subsequentes em que se utilizaram volumes na ordem das dezenas de microlitros, deu-se preferência aos ESI-Na.

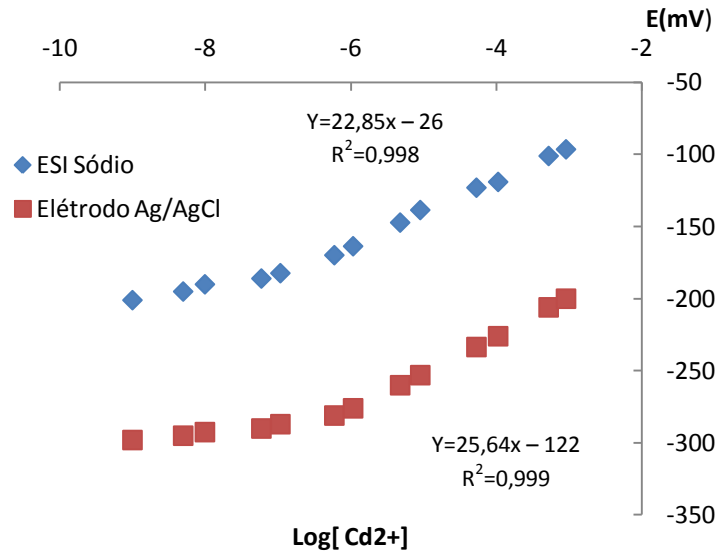


Figura:3.8 - Curvas de calibração realizadas no mesmo dia com o mesmo ESI-Cd, utilizando como eléctrodos de referência um eléctrodo de Ag/AgCl de dupla junção e um ESI-Na (utilizado como pseudorreferência), num volume de 100 mL de solução.

A repetibilidade, isto é, a habilidade de um transdutor reproduzir os sinais de saída, obtidos com as mesmas soluções de amostra nas mesmas condições operacionais [49, 50], foi estudada. Foram avaliados os resultados de quinze leituras consecutivas em dois níveis de concentração ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-5} e 10^{-3} mol/L) e em diferentes volumes de amostra (25 e 1,5 mL).

Nos ensaios com 25 mL de solução padrão usou-se o eléctrodo comercial como referência. Para a solução de concentração mais baixa obteve-se um DP na resposta de $\pm 8,6$ mV, o que correspondeu a um coeficiente de variação (CV) de 2,3%, e um tempo médio de estabilização da resposta de 40 s. Para a concentração mais elevada verificou-se uma ligeira melhoria na precisão das medições ($\pm 6,2$ mV; CV de 3,1%) e o tempo médio de resposta era de 35 s. Estes resultados foram obtidos com o mesmo eléctrodo e representam o comportamento típico observado na maioria dos outros ESI-Cd estudados.

Posteriormente foi estudada a repetibilidade destes ESI-Cd mas utilizando um volume de solução menor (1,5 mL), uma concentração constante em catião sódio (fundo iónico de NaNO_3 10^{-5} mol/L) e a pseudorreferência de sódio. Foi obtido um DP da resposta de $\pm 1,6$ mV (CV= 0,8%). Estes ensaios mostraram que, embora apenas tenha sido estudada a resposta à concentração mais baixa, foi obtida uma acentuada

melhoria de repetibilidade de resposta relativamente aos dois níveis de concentração estudados nos ensaios de 25 mL.

Para avaliar a reprodutibilidade da resposta e o tempo de vida dos ESI-Cd foram realizadas cinco calibrações, em que se efetuaram adições sucessivas de solução padrão de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 100 mL de água. Como referência foi utilizado um ER-Ag com solução interna de $\text{KCl } 10^{-3} \text{ mol/L}$. Os resultados obtidos para um eletrodo, que foram representativos do comportamento dos restantes ESI-Cd estudados, quando submetidos aos mesmos testes estão apresentados na *Figura 3.9*. A primeira calibração deste ESI foi feita ao dia 14 de armazenamento de modo a avaliar os efeitos de condicionamento e armazenamento. Nos dias 15 e 16 é notória uma alta reprodutibilidade das medições, apresentando declives das curvas de calibração bastante semelhantes (*Figura 3.9*). Após o 21 dia de vida, o ESI-Cd apresentou um coeficiente de regressão elevado ($r=0,994$) mas uma acentuada diminuição no valor do declive da resposta, como se pode observar no gráfico da *Figura 3.10*. Devido aos resultados obtidos, os ESI-Cd só foram utilizados nos primeiros 15 dias de vida, garantindo assim uma resposta aceitável, embora se tenha feito diariamente a verificação do estado de calibração do eletrodo.

3.2. Dissolução dos Nanocristais de CdS

Para o imunoensaio desenvolvido neste trabalho, foi escolhido um anticorpo secundário altamente específico para a *Salmonella* marcado com nanocristais de CdS [38], possibilitando assim a deteção potenciométrica do evento de ligação anticorpo-antigénio e a posterior correlação do sinal adquirido com a concentração efetiva do antigénio na solução amostra analisada. Dado que os ESI utilizados como eletrodo indicador neste trabalho são altamente sensíveis para Cd^{2+} , tentou-se otimizar a capacidade de dissolução dos nanocristais de CdS para quantificação do analito. Inicialmente foi estudada a dissolução dos NC de CdS de forma isolada e, posteriormente com a presença de matéria orgânica, ou seja, a dissolução do complexo Ab-NC.

O composto químico escolhido para o estudo da dissolução dos NC foi o peróxido de hidrogénio, devido aos resultados favoráveis divulgados no trabalho de *Numnuam et al* em 2008 [47], ou no trabalho desenvolvido por *Thürer et al* em 2007, em que o NC tinha uma estrutura semelhante (NC de CdSe) [61]. O efeito da luz na

dissolução dos NC de CdS também avaliado e optou-se por realizar estes ensaios na presença da luz, mantendo a porta da gaiola de faraday aberta, apesar de interferir negativamente na estabilidade da resposta, pois constatou-se que a velocidade da reação era superior.

Foram testadas várias concentrações de peróxido de hidrogénio com o objetivo de otimizar a composição da mistura que permitisse melhorar a dissolução dos NC de CdS, assim como destruir as ligações existentes entre o NC e o anticorpo secundário, quando se encontram ligados. No gráfico da *Figura 3.9* estão representados os valores de ΔE (potencial de resposta subtraído do valor de potencial da solução de branco ou seja uma solução padrão sem o elemento alvo do estudo (composta por 150 μL H_2O_2 3% (v/v) e 5 μL PBS) em função do tempo (min), após a adição de 5 μL de soluções de nanocristais de CdS (volume final =160 μL), obtidas por diluição prévia de 10 e 100 vezes da suspensão mãe que nos foi fornecida e com concentração em NC não especificada. Nestas determinações foram utilizados, um ESI-Cd e um elétrodo de referência de Ag/AgCl com dupla junção, com KCl 3 mol/L no compartimento interno e NaNO_3 10^{-3} mol/L no compartimento externo como elétrodo de referência.

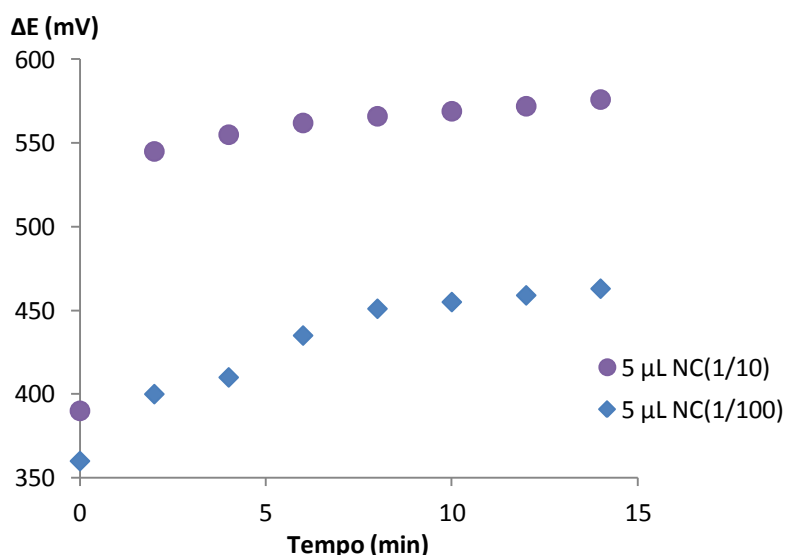


Figura:3.9 - Variação do potencial ao longo do tempo, resultante da dissolução de diferentes concentrações de nanocristais de CdS (obtidas por diluição prévia de 10 e 100 vezes da suspensão mãe) em peróxido de Hidrogénio 3% (v/v), utilizando um ESI-Cd e um de ER-Ag/AgCl de dupla junção e um volume final de 160 μL .

Face aos resultados obtidos, confirmou-se que o peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) é capaz de dissolver os NC de CdS, num curto período de tempo (entre 10 a 15 min) e que o sinal potenciométrico obtido é tanto maior quanto maior é a concentração de NC de CdS na suspensão.

Nos ensaios cujos resultados são apresentados na *Figura 3.10* foi utilizado um ESI-Na como referência para traçar uma curva de calibração em função da concentração de NC. Foram testadas cinco soluções com diferentes concentrações de NC de CdS, obtidas por diluição prévia 100, 200, 250, 400 e de 500 vezes a partir suspensão inicial. Através da análise dos resultados obtidos foi visível o aumento da diferença de potencial, com o aumento da concentração de NC na solução amostra. O tempo de dissolução (cerca de 15 min), foi similar ao registado com o eléctrodo de referência de Ag/AgCl, apesar de todas as medições terem sido prolongadas até aos 30 min, para garantir uma dissolução completa. Adicionalmente constatou-se que as medições com o ESI-Na apresentaram uma estabilidade de leitura superior à dos eléctrodos de Ag/AgCl e devido a esse facto, nos restantes ensaios realizados, optou-se pelo ESI-Na como eléctrodo de referência.

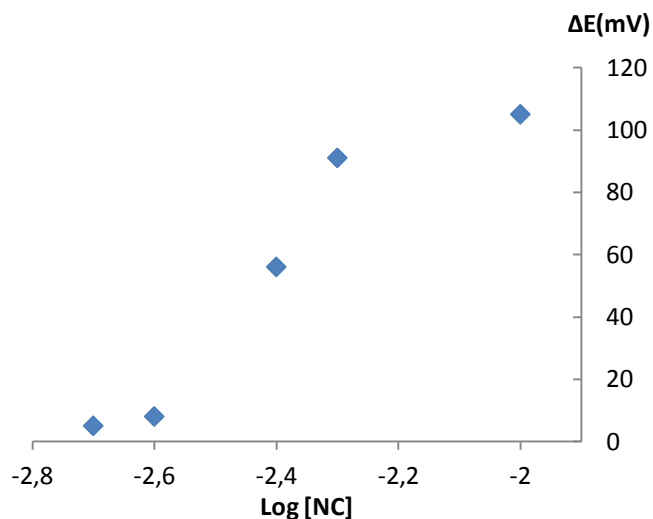


Figura:3.10 - Valores da diferença de potencial medidos entre um ESI-Cd e um ESI-Na após 30 min de dissolução de nanocristais de CdS, em soluções com diferentes concentrações em CdS (fatores de diluição de 100, 200, 250, 400 e 500).

Tendo por base estes estudos da dissolução dos NC de forma isolada (*Figura 3.9 e 3.10*), estudou-se o tempo de dissolução do CdS (NC) do anticorpo marcado, utilizando a concentração de peróxido de hidrogénio (3%; v/v) previamente

estabelecida, com o intuito de verificar a influência da introdução de matéria orgânica na solução amostra na dinâmica da reação. Verificou-se que o tempo necessário para a dissolução dos NC é superior, quando estão ligados ao anticorpo.

Posteriormente foi construída uma curva de calibração para diferentes concentrações de nanocristais correspondendo, por sua vez a diferentes concentrações de Cd^{2+} , para avaliação da sensibilidade do detetor quando inserido nas condições operacionais específicas do imunoenensaio, tendo em conta o efeito da concentração do peróxido de hidrogénio (3, 30 ou 50%; v/v) e do seu volume (160 ou 20 μL), a repetibilidade entre amostras e entre eléctrodos, assim como o limite de deteção alcançado.

Para construção da curva de resposta do eléctrodo a diferentes concentrações de conjugado Ab-NC, foi utilizada uma suspensão pré-preparada num projeto anterior [7, 38]. Segundo o trabalho desenvolvido por Freitas et al, a concentração da suspensão original de anticorpo marcado com NC de CdS é de 1,25 $\mu\text{g/mL}$.

No gráfico da *Figura 3.11* encontra-se uma curva efetuada com recurso às diferentes soluções de conjugado Ab-NC (de 0,00125 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$), obtidas previamente por diluição da solução original. Por uma questão de comodidade de leitura, o volume final da solução amostra foi superior (160 μL) ao volume utilizado nos imunoenaios com as *Salmonellas* (20 μL), e continha a seguinte composição: 150 μL de H_2O_2 a 3% (v/v), 5 μL de Ab-NC e 5 μL de PBS (pH = 4,4). Os valores de ΔE foram registados 30 min após a adição do conjugado Ab-NC e calculados por subtração do valor de potencial da solução de branco medido (solução padrão sem adição conjugado Ab-NC) ao valor de potencial (E; mV) medido. Através destes resultados confirmou-se o aumento da diferença de potencial (ΔE), com o aumento da concentração do conjugado Ab-NC adicionado à solução amostra.

Está descrito por outros autores que o peróxido de hidrogénio não causa qualquer interferência na resposta dos ESI [61] e tanto os potenciais registados antes da adição do conjugado Ab-NC, como depois de alcançar o equilíbrio de dissolução são independentes da concentração do dissolvente. Desta forma, para a otimização do tempo da reação de dissolução dos NC, foram testadas várias concentrações de peróxido (3, 30 e 50%; v/v), utilizando concentrações de conjugado Ab-NC ($1,0 \times 10^{-3}$, $1,92 \times 10^{-3}$ e $3,2 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$) diferentes. Para uma demonstração mais efetiva e robusta do efeito da concentração do peróxido na velocidade da reação, à medida que foi aumentada a concentração do peróxido dobrou-se a concentração do conjugado Ab-

NC, sendo o volume final da solução amostra aproximadamente igual (125 μL a 130 μL). Os resultados dos valores das diferenças de potencial medidos ao longo do tempo quando se usou H_2O_2 a 3% (v/v), estão apresentados no gráfico A da *Figura 3.12*. Este gráfico permite verificar que a reação de dissolução dos NC só começou a ocorrer aproximadamente 30 minutos após o início do ensaio. Com a utilização do H_2O_2 a 30% (v/v), reação foi bastante mais rápida, como se pode observar pelos resultados obtidos, que estão apresentados no gráfico B da *Figura 3.12*, onde se verifica uma dissolução completa após 40 a 50 min do início da reação, em vez de 80 min, para H_2O_2 3% (v/v), apesar da solução amostra possuir aproximadamente o dobro da concentração de Ab-NC. No gráfico C da *Figura 3.12*, estão apresentados os resultados com da utilização do H_2O_2 50% (v/v), para a dissolução dos NC numa suspensão com uma concentração de $3,2 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/mL}$, superior à concentração testada com o H_2O_2 30% (v/v). Verificou-se também uma dissolução completa dos NC aproximadamente 40 a 50 min após o início do ensaio.

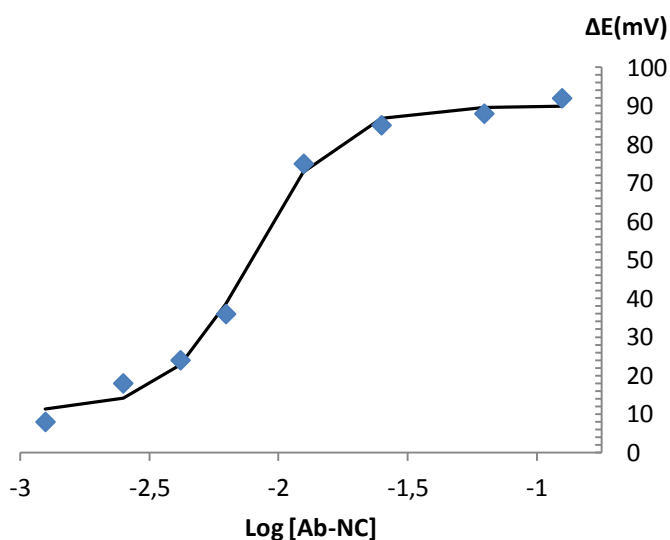


Figura:3.11 - Gráfico representativo da resposta do eletrodo à amostra (volume = 160 μL) fortificada com diferentes concentrações de Ab-NC ($\mu\text{g/mL}$).

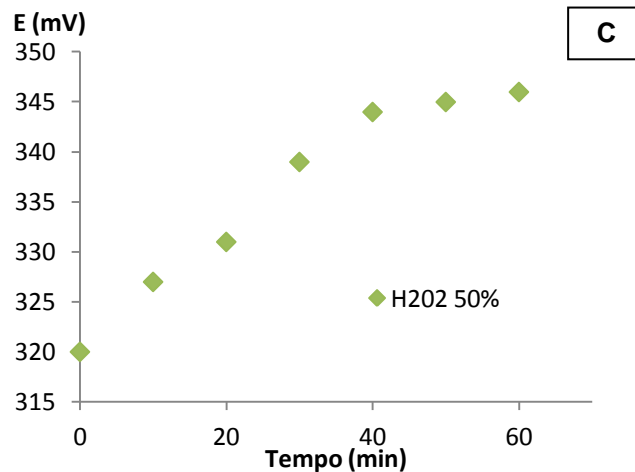
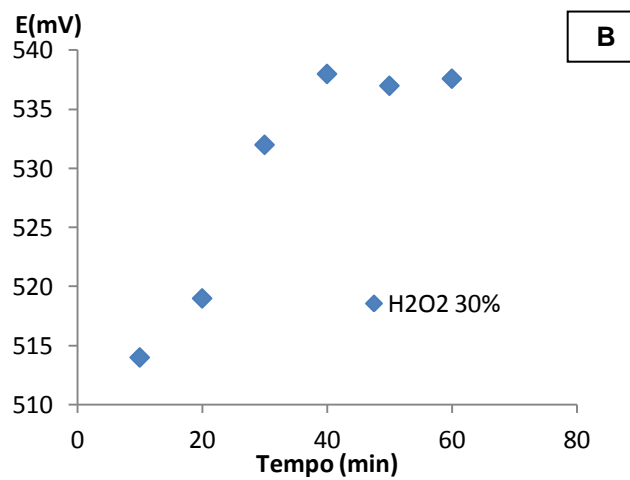
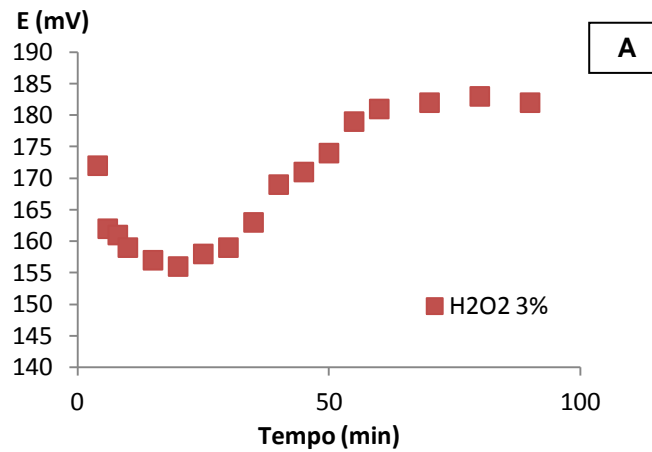


Figura:3.12 - Resposta potenciométrica à dissolução dos NC de CdS, através de soluções com concentrações diferentes de Ab-NC e volumes finais de 125 e 130 μL :

- A) $[\text{Ab-NC}] = 1,0 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$, utilizando um volume final de 125 μL (10 μL de PBS + 110 μL H_2O_2 3% (v/v) + 5 μL conjugado Ab-NC (0,0025 $\mu\text{g/mL}$);
- B) $[\text{Ab-NC}] = 1,92 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ utilizando um volume final de 130 μL (10 μL de PBS + 110 μL H_2O_2 30% (v/v) + 10 μL Ab-NC (0,0025 $\mu\text{g/mL}$);
- C) $[\text{Ab-NC}] = 3,2 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ utilizando um volume final de 130 μL (10 μL de PBS + 110 μL H_2O_2 50% (v/v) + 10 μL Ab-NC (0,0042 $\mu\text{g/mL}$).

A concentração de H₂O₂ 30% (v/v), foi a escolhida para os imunoenaios com as *Salmonellas*, pois o aumento da concentração do peróxido de hidrogénio de 30 para 50% não teve efeitos significativos.

Para simular todas as condições dos imunoenaios com *Salmonellas*, foram realizadas experiências em que se analisaram soluções potenciometricamente, com um volume final de solução de 20 µL, contendo 10 µL de H₂O₂ a 30% (v/v) e 10 µL de suspensões de Ab-NC com concentrações entre 0,00125 e 0,0625 µg/mL. Para cada concentração estudada, foram realizadas três réplicas, que foram medidas de forma consecutiva, após a leitura na solução de fundo. Os resultados obtidos estão apresentados no gráfico da *Figura 3.13*, onde se pode observar a repetibilidade existente entre as três réplicas efetuadas. A tendência de resposta obtida (valores médios da diferença de potencial registada) foi calculada, apresentando um declive da resposta de 31,4 mV/década, na zona linear (0,0025 a 0,0125 µg/mL) e desvio padrão médio das leituras referentes a todas as concentrações de ± 2,6 mV/década, demonstrando alta repetibilidade da resposta por parte dos ESI. O LD calculado foi de 0,002 µg/mL.

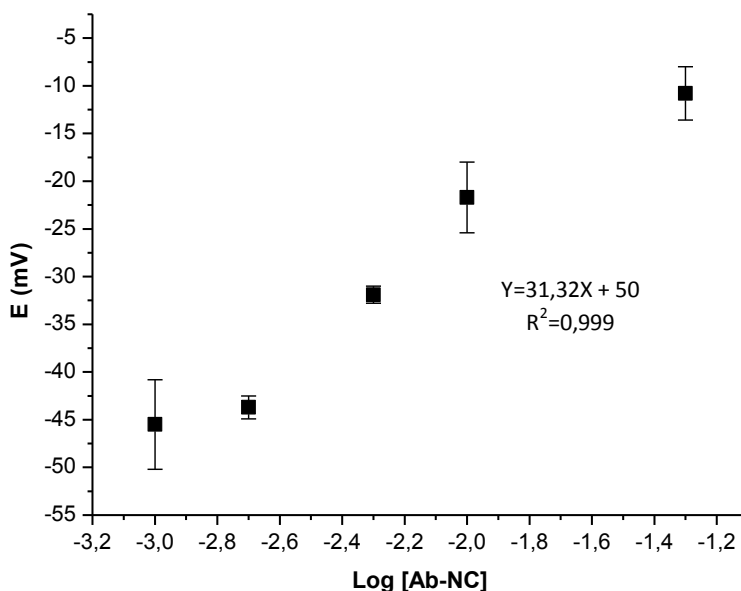


Figura:3.13 - Gráfico representativo da resposta de um ESI-Cd, a amostras (volume = 20 µL) fortificadas com diferentes concentrações de Ab-NC.

Através dos estudos realizados, pôde-se comprovar que o H₂O₂ tem um efeito de dissolução mais demorado nas análises em que foi estudada a capacidade de dissolução dos NC de CdS, quando estes se encontravam ligados ao seu anticorpo específico (Ab-NC), sugerindo a interferência da matéria orgânica, (que neste estudo está presente em maiores quantidades), na cinética da reação. Constatou-se que a utilização de peróxido de hidrogénio mais concentrado aumentava a velocidade da reação de dissolução dos NC e que nos ensaios com o conjugado Ab-NC diluído em peróxido de hidrogénio, volumes de amostra mais reduzidos possibilitam alcançar limites de deteção de cádmio mais favoráveis, aumentando a sensibilidade da leitura por parte dos elétrodos seletivos de iões.

3.3. Determinação Potenciométrica da *Salmonella typhimurium*

Para a determinação potenciométrica da *Salmonella typhimurium*, seguiram-se as condições otimizadas ao longo deste projeto e as descritas no esquema de ensaio referido no Capítulo 2 (ver Figura 2.7), utilizando PBS com pH = 4,4, para a incubação da *Salmonella*, pois contém iões que garantem a estabilização dos componentes biológicos e apresenta um pH ótimo para a utilização dos ESI desenvolvidos neste trabalho, que foi definido anteriormente para valores de pH entre 3 e 6.

No gráfico da Figura 3.14, são apresentados os valores de diferença de potencial (ΔE) e respetivo DP medidos em soluções contendo *Salmonellas* com concentrações de 10 a 1×10^8 CFU/mL, utilizando um volume de amostra de 10 μ L para a pré-concentração. Todos os potenciais apresentados resultam da subtração do valor obtido na solução de fundo (solução amostra sem a presença da bactéria) à média dos valores obtidos nas três réplicas, realizadas para cada uma das concentrações testadas. Verificou-se um aumento da diferença de potencial, à medida que a concentração de *Salmonellas* foi aumentada, sugerindo uma correta agregação do anticorpo secundário à bactéria e uma dissolução e conversão eficaz dos NC de CdS para Cd²⁺.

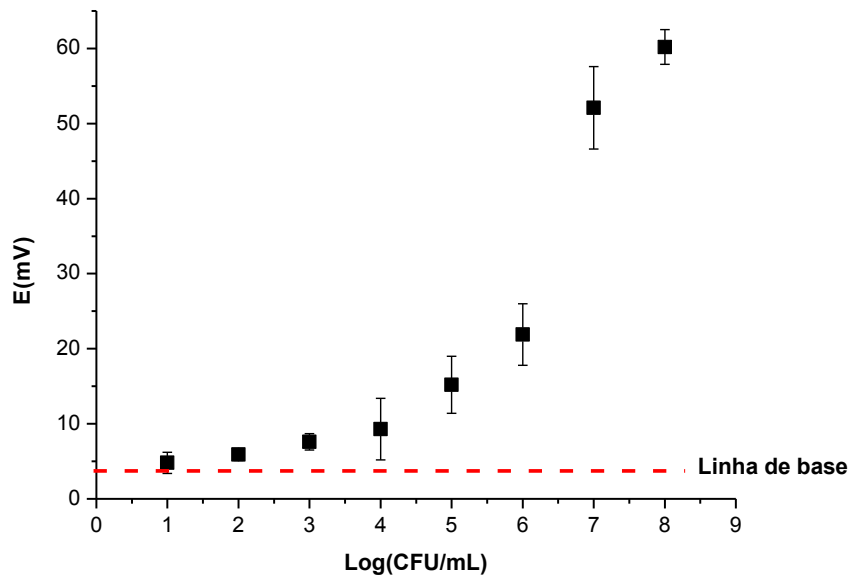


Figura:3.14 - Detecção potenciométrica de *salmonellas* incubadas em PBS pH 4,4, com uma pré-concentração de 10 μ L.

Foram também testados volumes diferentes de amostra (10 μ L, 50 μ L e 100 μ L) para a pré-concentração da *Salmonella* e analisado o seu efeito na detecção potenciométrica, tendo em conta o tempo total necessário para a realização de cada ensaio[62] Os limites de detecção (concentração do analito, que desencadeia um sinal instrumental ΔE (mV) diferente do sinal e fundo), foram calculados através dos resultados apresentados nas curvas da *Figura 3.15* e por aplicação de um modelo 4P.

Estes resultados evidenciam o efeito da pré-concentração das *Salmonellas* uma vez que independentemente do volume da amostra usado no ensaio, o volume final para quantificação do Cd^{2+} livre foi 20 μ L. Utilizando um volume de 10 μ L de amostra de *Salmonellas* o limite de detecção calculado foi de 1100 CFU/mL e, com um volume de amostra de 100 μ L, o LD foi de 20 CFU/mL.

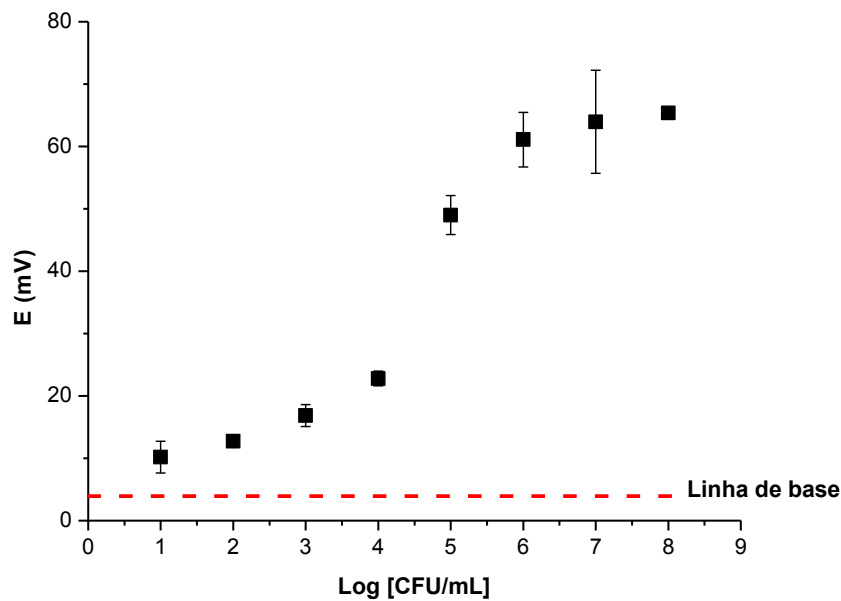


Figura:3.15 - Detecção potenciométrica de *salmonellas* incubadas em PBS pH 4,4, utilizando 100 μ L de solução de *Salmonellas* na pré-concentração.

O volume de amostra que conduziu a uma pré-concentração mais eficaz, foi de 100 μ L de *Salmonella*, verificando-se que um maior volume de amostra, desencadeará uma resposta mais sensível por parte dos ESI-Cd e conseqüentemente limites de detecção mais baixos. O tempo médio estimado para o ensaio completo, incluindo lavagens e a medição potenciométrica, foi de 75 min.

3.3.1. Determinação Potenciométrica da *Salmonella typhimurium* em amostras de leite

Para a validação do método apresentado, fez-se a contaminação de uma amostra de leite bovino comercial com *Salmonella typhimurium* (1×10^2 e 1×10^3 CFU/mL). Nestes dois ensaios de recuperação, o volume de pré-concentração escolhido foi de 100 μ L (Figura 3.15). Os resultados obtidos por correlação com a curva de calibração realizada em PBS encontram-se na Tabela 3.3.

A recuperação média das *Salmonellas* a partir da matriz foi consistente na gama de concentrações avaliadas, tendo um valor médio de $93,7 \pm 2,8$ (Média \pm DP) As taxas de recuperação obtidas (83,9% e 103,6%) encontram-se dentro da gama de valores aceitáveis para ensaios imunológicos, revelando a aplicabilidade do estudo

descrito na detecção de baixas concentrações de *Salmonella*, mesmo em amostras reais, com uma matriz mais complexa.

Tabela:3.3 - Recuperação (%) da *Salmonella typhimurium* (1×10^2 e 1×10^3 CFU/mL), em amostras de leite bovino.

Concentração teórica (CFU/mL)	Recuperação (%)		
	n	Média± DP	CV (%)
100	2	83,9±4,1	4,9%
1000	2	103,6±1,6	1,6%
Média	-	93,7±2,8	3%

Média± DP=Média±Desvio Padrão; CV=Coeficiente de variação; n=nº de amostras

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que é possível desenvolver um método para análise de *Salmonellas* em leite, combinando um imunoensaio de formato sanduíche com a detecção potenciométrica, através de microelétrodos seletivos com baixo custo e de fácil utilização. Para o efeito foram exploradas a simplicidade da detecção potenciométrica, as potencialidades do uso de nanopartículas magnéticas de ferro recobertas a ouro (Fe@Au) e a amplificação do sinal com nanocristais de CdS.

O tempo de vida estimado dos elétrodos seletivos a catião Cd^{2+} (ESI-Cd) e elétrodos seletivos a catião Na^+ (ESI-Na) construídos foi de aproximadamente 21 dias. A duração dos elétrodos foi elevada, tendo em conta o método de construção, demonstrou uma elevada estabilidade da membrana polimérica construída e uma baixa probabilidade de decomposição e transferência dos seus componentes para a solução amostra. Adicionalmente verificou-se que os microelétrodos de Ag/AgCl com $\text{KCl } 10^{-3} \text{ mol/L}$ podem ser utilizados como referência nas análises potenciométricas com ESI-Cd em volumes na ordem das dezenas dos microlitros, contudo os ESI-Na demonstraram ser mais robustos.

Com a otimização dos ESI desenvolvidos neste trabalho conseguiram-se obter baixos níveis de detecção de cádmio em soluções aquosas padrão, (limite de detecção de $3,6 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ em volumes de 100 mL), tendo sido igualmente sensíveis aos nanocristais de CdS imobilizados em anticorpos com alta especificidade (limite de detecção do conjugado anticorpo-nanocristais = $0,002 \text{ } \mu\text{g/mL}$), tendo-se verificado uma maior eficácia de dissolução dos nanocristais com a utilização de concentrações mais elevadas de peróxido de hidrogénio.

O ensaio desenvolvido permitiu a detecção de uma baixa concentração de *Salmonella typhimurium*, 20 CFU/mL, usando 100 μL de amostra, em cerca de 75 min. Uma amostra de leite bovino, contaminada a dois níveis de concentração (1×10^2 e 1×10^3 CFU/mL) de *Salmonella* foi analisada, tendo sido obtidas boas taxas de recuperação (de 83,9% e 103,6%). Estes resultados permitiram concluir que o método

é bastante sensível e pode ser aplicado à análise de *Salmonella typhimurium* em amostras reais.

Este método foi inovador e amigo do ambiente, seguro, simples, rápido e económico; em que as amostras líquidas foram quantificadas diretamente. Estes métodos permitirão a avaliação do grau de contaminação de alimentos por organismos patogénicos podendo vir-se a tornar numa alternativa aos métodos tradicionais (análise fenotípica / marcadores metabólicos) ou ao método de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*, PCR) pois têm potencialidades para a análise de vários microrganismos em simultâneo e em tempo real, parâmetro essencial quando se pretende a deteção de bactérias em alimentos, e em especial, se estes são perecíveis ou semi-perecíveis [10], podendo vir a ser uma ferramenta indispensável em qualquer laboratório de controlo de qualidade

REFERÊNCIAS

1. Lippa, P.B., L.J. Sokoll, and D.W. Chan, *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2001. 314(1–2): p. 1-26.
2. Scientific, T. *Overview of ELISA*. 2013 [cited 2013 Julho]; Available from: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>.
3. Buhlmann, P.C., Li D. , *Ion-Selective Electrodes With Ionophore-Doped Sensing Membranes*, in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, P.A.G.e.J.W. Steed, Editor. 2012, John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-74640-0.: Minneapolis, MN, USA. p. 2539 - 2576.
4. Wroblewski, W. *Ion-selective electrodes*. 2005 [cited 2013 27 Maio]; Available from: <http://csrg.ch.pw.edu.pl/tutorials/ise/>.
5. Thurer, R., et al., *Potentiometric Immunoassay with Quantum Dot Labels*. Analytical Chemistry, 2007. 79: p. 5107-5110.
6. F., B.R., Villar; F. J., Angulo; R., Tauxe; B., Swaminathan, *Salmonella Nomenclature*. Journal Clinical Microbiology, 2000. 38(7): p. 2465–2467.
7. Freitas, M., *Electrochemical magnetic immunosensor for Salmonella typhimurium detection in milk samples*, in *Faculdade de Farmácia*. 2012, Universidade do Porto: Porto.
8. Salam, F. and I.E. Tothill, *Detection of Salmonella typhimurium using an electrochemical immunosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. 24(8): p. 2630-2636.
9. Leonard, P., et al., *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. 32(1): p. 3-13.
10. Lin-Hui, S.C.-H., Chiu, *Current system of Salmonella nomenclature used by WHO, CDC, and ASM*, in *Antimicrobe - Infectious Disease and Antimicrobial Agents*.
11. Tindall, B.J.G., P. A. D; Garrity, G. M. ; Euzéby, J. P., *Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella*. IJSEM 2005. 55 (1): p. 521-524

12. Fields, J.M.J.W.B.D.M.M.P., *Molecular Determination of H Antigens of Salmonella by Use of a Microsphere-Based Liquid Array*. *Journal Clinical Microbiology*, 2011. 49(2): p. 565–573.
13. Guibourdenche, M., et al., *Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme*. *Research in Microbiology*, 2010. 161(1): p. 26-29.
14. Patrick, G.F.-X., Weill, *Antigenic formulas of the Salmonella serovars*, in *World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*. 2007, Pasteur Institute: Paris, France.
15. Esteves, A., *Perigos microbiológicos em alheira: Principais vias de contaminação por Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens e Salmonella spp*, in *Ciências Veterinárias*. 2005, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
16. Pui, C.F., et al., *Simultaneous detection of Salmonella spp, Salmonella Typhi and Salmonella Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR*. *Food Control*, 2011. 22(2): p. 337-342.
17. Pui, C.F.W., W. C.; Chai, L. C.; Tunung, R.; Jeyaletchumi, P.; Noor Hidayah, M. S.; Ubong, A.; Farinazleen, M. G.; Cheah, Y. and R. K. and Son, *Salmonella: A foodborne pathogen*. *International Food Research Journal*, 2011. 18: p. 465-473.
18. EFSA. *Salmonella*. 2010 [cited 2013 16 Maio]; Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella.htm>.
19. Cláudia Almeida, D.M., Ângela Machado, Isaura Terra, Lucília Vieira, Joaquim Cunha, *Gastrenterite a Salmonella em Idade Pediátrica*. *Acta Médica Portuguesa*, 2012 25(4): p. 219-223.
20. Lazcka, O., F.J.D. Campo, and F.X. Muñoz, *Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. 22(7): p. 1205-1217.
21. Afonso, A.S., et al., *Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. 40(1): p. 121-126.
22. Wilson, G.S., Gifford, R., 2005, *Biosensors for real-time in vivo measurements*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005. 20(12): p. 2388–2403

23. Cheung, P.-Y. and K.M. Kam, *Salmonella in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods*. Food Research International, 2012. 45(2): p. 802-808.
24. Sua, L., et al., *Microbial biosensors: A review*. Biosensors and Bioelectronics 2011. 26: p. 1788–1799.
25. Belkin, S., *Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants*. Current Opinion in Microbiology, 2003. 6(3): p. 206-212.
26. Cunningham, A.J., *Introduction to Bioanalytical Sensors.*, ed. J.W. Sons. 1998, New York/Chichester
27. Wilson, G.S. and R. Gifford, *Biosensors for real-time in vivo measurements*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. 20(12): p. 2388-2403.
28. Byfield, M.P. and R.A. Abuknesha, *Biochemical aspects of biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 1994. 9(4–5): p. 373-399.
29. S.F. D'Souza, *Microbial Biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2001. 16(6): p. 337-353.
30. Borisov, S.M., Wolfbeis, *Optical biosensors*. Chemi Rev, 2008. 108(2): p. 423-461.
31. R. Theâvenot, D., et al., *Electrochemical Biosensores: Recommended Definitions And Classification*. 1999, IUPAC: Great Britain.
32. Bock, J.L., *The new era of automated immunoassay*. American Journal Clinical Pathology, 2000. 113: p. 628–646.
33. Pei, X., et al., *Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review*. Analytica Chimica Acta, 2013. 758(0): p. 1-18.
34. Hi-Yung Hsueh, J.H.-B., *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. 2011, South Dakota State University: Brookings, South Dakota.
35. Jeong, S.-J., et al., *Two-layered piezoelectric bender device for micro-power generator*. Sensors and Actuators A: Physical, 2008. 148(1): p. 158-167.
36. Su, L., et al., *Microbial biosensors: A review*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. 26(5): p. 1788-1799.

37. Li, Y., et al., *Amperometric immunosensor for the detection of Escherichia coli O157:H7 in food specimens*. Analytical Biochemistry, 2012. 421(1): p. 227-233.
38. Freitas, M., et al., *Iron oxide/gold core/shell nanomagnetic probes and CdS biolabels for amplified electrochemical immunosensing of Salmonella typhimurium*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. 51(0): p. 195-200.
39. Zhang, X., et al., *Development of an electrochemical immunoassay for rapid detection of E. coli using anodic stripping voltammetry based on Cu@Au nanoparticles as antibody labels*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. 24(7): p. 2155-2159.
40. Dungchai, W., et al., *Salmonella typhi determination using voltammetric amplification of nanoparticles: A highly sensitive strategy for metalloimmunoassay based on a copper-enhanced gold label*. Talanta, 2008. 77(2): p. 727-732.
41. Yang, G.-J., et al., *A reusable capacitive immunosensor for detection of Salmonella spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle monolayers*. Analytica Chimica Acta, 2009. 647(2): p. 159-166.
42. Dong, J., et al., *A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of Salmonella typhimurium in milk*. Food Chemistry, 2013. 141(3): p. 1980-1986.
43. Ercole, C., et al., *A biosensor for Escherichia coli based on a potentiometric alternating biosensing (PAB) transducer*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2002. 83(1-3): p. 48-52.
44. O'Kennedy, P.J.C.S.H.P.L.a.R.J., *Antibody production, design and use for biosensor-based applications*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. 20: p. 10-26.
45. Jiang, X., et al., *Immunosensors for detection of pesticide residues*. Biosensors and Bioelectronics, 2008. 23(11): p. 1577-1587.
46. Eiggins, B., *Chemical Sensors and Biosensors*. 2002: John Wiley & Sons Ltd.
47. Apon, N.K.Y., Chumbimuni-Torres; Yun, Xiang; Ralph, Bash; Panote, Thavarungkul; Proespichaya, Kanatharana; Ernö, Pretsch ;Joseph, Wang; Eric, Bakker

Aptamer-Based Potentiometric Measurements of Proteins Using Ion-Selective Microelectrodes. Analytical Chemistry, 2008. 80(3): p. 707–712.

48. Buck, R.P. and E. Lindner, *RECOMMENDATIONS FOR NOMENCLATURE OF ION-SELECTIVE ELECTRODES - (IUPAC RECOMMENDATIONS 1994)*. Pure and Applied Chemistry, 1994. 66(12): p. 2527-2536.

49. Lindner, R.P.B.E., *Recomendations for Nomenclature of Ion-selective Eletrodes*. Pure and Applied Chemistry, 1994. 66(12): p. 2527-2536.

50. Sat, Y.U.K.U.H., *Selectivity Coefficients For Ion-Selective Electrodes: Recommended Methods For Reporting K_{rb} Values*. Pure and Applied Chemistry, 1995. 67(3): p. 507-518.

51. Pérez-López, B. and A. Merkoçi, *Nanomaterials based biosensors for food analysis applications*. Trends in Food Science & Technology, 2011. 22(11): p. 625-639.

52. Tartaj, P., et al., *chapter 5 Synthesis, Properties and Biomedical Applications of Magnetic Nanoparticles*, in *Handbook of Magnetic Materials*, K.H.J. Buschow, Editor. 2006, Elsevier. p. 403-482.

53. Gómez-Hens, A., J.M. Fernández-Romero, and M.P. Aguilar-Caballos, *Nanostructures as analytical tools in bioassays*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. 27(5): p. 394-406.

54. Seip, C.T. and C.J. O'Connor, *The fabrication and organization of self-assembled metallic nanoparticles formed in reverse micelles*. Nanostructured Materials, 1999. 12(1–4): p. 183-186.

55. Hussain, S.M., et al., *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*. Toxicology in Vitro, 2005. 19(7): p. 975-983.

56. Xu, Y. and E. Wang, *Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles*. Electrochimica Acta, 2012. 84(0): p. 62-73.

57. Liu, G. and Y. Lin, *Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays*. Talanta, 2007. 74(3): p. 308-317.

58. Wardak, C., *A Comparative Study of Cadmium Ion-Selective Electrodes with Solid and Liquid Inner Contact*. Eletroanalysis, 2012. 24 (1): p. 85 – 90.

59. Aodhmar M. Cadogan, M.D., M. Anthony McKervey, Stephen J. Harris, *Sodium-selective Polymeric Membrane Electrodes Based on Calix[4]arene Ionophores*. *Analyst*, 1989. 114: p. 1551-1554.
60. Ernő Lindner ; Yoshio, U., *Performance evaluation criteria for preparation and measurement of macro- and microfabricated ion-selective electrodes*. 2008, IUPAC. p. 85-104.
61. Thüerer R, V.T., Hirayama M, Wang J, Bakker E, Pretsch E., *Potentiometric immunoassay with quantum dot labels*. *Analytical Chemistry*, 2007. 79(13): p. 5107-10.
62. Miller, J.N. and J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 2005, Pearson Education: Inghaterra.

