

STELLA RICARDO DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE  
DE UM BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE *Escherichia*  
*coli* EM ÁGUA



**Plano de Monografia apresentado ao  
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes,  
da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como pré-requisito para a  
obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO/ 2023

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, e na COPPE, do Centro de Tecnologia, UFRJ, sob a orientação dos Professores Marco Antônio Lemos Miguel, Marcelo Martins Werneck, e coorientação da Professora Regina Célia da Silva Barros Allil.**

### CIP - Catalogação na Publicação

S237a Santos, Stella Ricardo  
Avaliação da sensibilidade e especificidade de um biossensor para detecção de Escherichia coli em água / Stella Ricardo Santos. -- Rio de Janeiro, 2023. 58 f.

Orientador: Marcelo Martins Werneck.  
Coorientador: Regina Célia da Silva Barros Allil.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Biossensor. 2. Escherichia coli. 3. Análise microbiológica de água. 4. Fibra óptica plástica. I. Werneck, Marcelo Martins, orient. II. Allil, Regina Célia da Silva Barros, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO(A): Stella Ricardo dos Santos**

**DRE: 120029211**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Sérgio Eduardo Fracalanza (Presidente)  
Prof. Raquel Regina Bonelli  
Prof. Mateus Gomes de Godoy  
Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida (Suplente)

**Título da Monografia: "Avaliação da sensibilidade e especificidade de um biossensor para detecção de *Escherichia coli* em água"**

**Local: Sala de seminários do DMM, IMPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 04 de dezembro de 2023 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 04 de dezembro de 2023.

**NOTA:**

10

Banca Examinadora:

[Assinatura]  
Prof. Sérgio Eduardo Fracalanza (Presidente)

[Assinatura]  
Prof. Raquel Regina Bonelli

[Assinatura]  
Prof. Mateus Gomes de Godoy

[Assinatura]  
Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida (Suplente)

**Aluno(a):**

**Orientador(a)**  
**(e coorientador):**

[Assinatura] [Assinatura] [Assinatura]  
Stella Ricardo dos Santos  
Prof. Marcelo Martins Werneck, Prof. Marco Antônio Lemos Miguel e Regina Célia da Silva Barros Allil

**Coordenadora de**

**TCC:**

[Assinatura]  
Prof. Marfnela Silva Laport

Dedico este trabalho aos meus pais, Jaqueline e Sidnei, que me apoiaram durante toda minha jornada, minha avó Irma, que me deu forças e inspiração, e minha irmã Letícia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado forças para seguir meus sonhos e me guiado para o meu caminho.

Aos meus pais que me ensinaram a importância dos estudos e a seguir meus sonhos para enfim me tornar independente e bem sucedida. A eles agradeço pelo apoio, os investimentos na minha educação, as palavras de força e carinho, os conselhos e os puxões de orelha. Também agradeço a minha avó que me inspirou e inspira mais a cada dia, minha madrinha que sempre torceu por mim e pelo o meu sucesso, e minha irmã que me distraiu em momentos de angústia e me fez rir.

Agradeço ao professor Marcão por todo apoio e conselhos nos momentos em que achei que nada daria certo. Obrigada por me guiar quando eu estava perdida no projeto e me mostrar que sou capaz.

Ao meu orientador Werneck, obrigada por me mostrar que consigo resolver coisas grandes sozinha e me mostrar que meu conhecimento vai além do que imaginei. Agradeço também a minha coorientadora Regina pelas palavras de incentivo e força ao longo da minha trajetória no projeto.

Sou grata a todos os meus colegas de laboratório, Antônio, Laura, Agnes, Giovanna, Giovanninha e Jessika. Obrigada pelos momentos divertidos que passamos juntos, todos os cafés acompanhados de conversas, e pelas ajudas quando eu mais precisava.

Agradeço aos meus amigos que pude conhecer na UFRJ, Virginia, Jéssica, Luiza, Matheus, Pedro e Vitória. Obrigada por todas as risadas, fofocas, e até momentos de desespero com provas juntos. Minha história na faculdade foi melhor com vocês ao meu lado todos os dias.

Aos meus melhores amigos de vida, Victor, Ágatha, Matheus, Renan, Gustavo e Andrea, obrigada por acreditarem em mim e no meu potencial, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, por comemorarem comigo minhas conquistas e vitórias, me darem colo e esperança nas derrotas, e por serem parte da minha história.

As minhas amigas Luiza, Larissa e Laís, que me apoiaram durante todo meu pré vestibular. Sem vocês eu não teria iniciado esse capítulo da minha vida. Agradeço a todos os meus professores que me ajudaram a chegar onde estou, desde criança até minha graduação.

Agradeço, ainda, a COPETEC pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

## RESUMO

STELLA RICARDO DOS SANTOS

### AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli* EM ÁGUA

**Orientadores:** Marco Antônio Lemos Miguel, Marcelo Martins Werneck  
**Coorientador:** Regina Célia da Silva Barros Allil

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Atualmente, os métodos para detecção de *Escherichia coli* em água demandam, em sua maioria, de 24 a 48 horas para obtenção dos resultados. Por esse motivo, estudos quanto ao desenvolvimento de métodos alternativos que sejam mais rápidos, porém ainda específicos e sensíveis, têm crescido a fim de substituir os métodos convencionais. Os biossensores são os dispositivos que se encaixam nessas características, sendo capazes de realizar análises em apenas alguns minutos, com boa especificidade e sensibilidade ao microrganismo de interesse. No presente estudo, um biossensor de fibra óptica plástica (POF) para detecção de *Escherichia coli* em água foi avaliado quanto a sua sensibilidade e especificidade. Para tal, amostras de POFs foram testadas quanto a sua capacidade de detectar a diferença do índice de refração dos meios externos a eles submetidos através de soluções com diferentes concentrações de sacarose. Após a confirmação da sensibilidade da POF, os biossensores foram testados com suspensões de microrganismos diferentes de *E. coli*, a fim de verificar se os mesmos gerariam alguma resposta do biossensor. Por fim, os biossensores foram testados com suspensões de diferentes concentrações de *Escherichia coli* para determinação do limite de detecção mínimo do sistema. A montagem do sistema sensorial é constituída de um fotodiodo LED que emite luz em uma das extremidades do biossensor, e um fotodetector responsável por captar a luz que atinge a outra extremidade do sensor, comparando a variação da intensidade da luz antes e depois da fixação dos microrganismos na superfície do biossensor. Os testes mostraram que a fibra óptica plástica foi capaz de detectar as diferenças de índice de refração do meio externo, confirmando sua capacidade de detectar *E. coli* em amostras a partir da variação do índice de refração do meio externo. A especificidade do biossensor se mostrou adequada, uma vez que o mesmo não respondeu às suspensões de diferentes microrganismos de modo a gerar resultados positivos. Quando testado frente a diferentes concentrações de microrganismos, o biossensor mostrou-se capaz de detectar células de *Escherichia coli* em amostras de no mínimo  $10^3$  unidades formadoras de colônia por mililitro em aproximadamente 15 minutos de análise.

**Palavras-chave:** biossensor, *Escherichia coli*, análise de água, fibra óptica plástica

## ABSTRACT

STELLA RICARDO DOS SANTOS

### EVALUATION OF THE SENSIBILITY AND SPECIFICITY OF A BIOSENSOR FOR *Escherichia coli* DETECTION IN WATER

**Orientadores:** Marco Antônio Lemos Miguel, Marcelo Martins Werneck  
**Coorientador:** Regina Célia da Silva Barros Allil

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Currently, most methods for detecting *Escherichia coli* in water require 24 to 48 hours to obtain the results. For this reason, studies into the development of alternative methods that are faster but still specific and sensitive have been growing in order to replace conventional methods. Biosensors are devices that fit these characteristics, being able to carry out analyses in just a few minutes, with good specificity and sensitivity to the microorganism of interest. In this study, a plastic optical fiber (POF) biosensor for detecting *Escherichia coli* in water was evaluated for its sensitivity and specificity. To this end, samples of POFs were tested for their ability to detect the difference in refractive index of external media submitted to them through solutions with different concentrations of sucrose. After confirming the sensitivity of the POF, the biosensors were tested with suspensions of microorganisms other than *E. coli*, in order to see if they would generate any response from the biosensor. Finally, the biosensors were tested with suspensions of different concentrations of *Escherichia coli* to determine the system's minimum detection limit. The sensory system assembly consists of an LED photodiode that emits light at one end of the biosensor, and a photodetector responsible for capturing the light that reaches the other end of the sensor, comparing the variation in light intensity before and after the microorganisms were attached to the surface of the biosensor. The tests showed that the plastic optical fiber was able to detect differences in the refractive index of the external medium, confirming its ability to detect *E. coli* in samples based on the variation in the refractive index of the external medium. The specificity of the biosensor proved to be adequate, since it did not respond to suspensions of different microorganisms in such a way as to generate positive results. When tested against different concentrations of microorganisms, the biosensor proved capable of detecting *Escherichia coli* cells in samples of at least  $10^3$  colony-forming units per milliliter in approximately 15 minutes of analysis.

**Key-words:** *Escherichia coli*, water analysis, biosensor, immunosensor, plastic optical fiber.

## RESUMO PARA LEIGOS

STELLA RICARDO DOS SANTOS

### AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE UM BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli* EM ÁGUA

**Orientadores:** Marco Antônio Lemos Miguel, Marcelo Martins Werneck  
**Coorientador:** Regina Célia da Silva Barros Allil

**Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A qualidade da água pode ser avaliada a partir da presença de algumas bactérias na mesma, como *Escherichia coli*. Nos dias atuais, os métodos para detecção dessa bactéria demoram em média de 24 a 48 horas. Com isso, estudos para o desenvolvimento de uma técnica de detecção mais rápida têm crescido, na qual os biossensores são aqueles que melhor se encaixam nessa necessidade. Os biossensores são dispositivos capazes de reconhecer um alvo específico gerando um sinal eletrônico quantificável. Nesse estudo, um biossensor foi avaliado para detecção da bactéria *E. coli* em água. Para isso, eles foram testados quanto a sua capacidade de medir as diferenças dos meios externos a partir de soluções com diferentes concentrações de açúcar. Além disso, foram testados na detecção de outras espécies de bactérias diferentes de *Escherichia coli* para avaliar a sua especificidade, e testados na detecção de diferentes concentrações da bactéria *E. coli* para verificar o valor mínimo que o sistema do biossensor pode detectar. Os resultados mostraram que o biossensor é capaz de medir as diferenças dos meios externos, detectando *Escherichia coli* em um valor mínimo de 1000 unidades formadoras de colônia da bactéria por mililitro de amostra em aproximadamente 15 minutos. Além disso, o biossensor não foi capaz de detectar as bactérias diferentes de *E. coli*, mostrando uma boa especificidade ao alvo de interesse.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do funcionamento dos componentes do biossensor .....	2
<b>Figura 2.</b> Princípio de funcionamento do meio Colilert para detecção de <i>Escherichia coli</i> .....	9
<b>Figura 3.</b> Fluxograma da metodologia do estudo .....	14
<b>Figura 4.</b> Propagação dos raios de luz em uma fibra óptica .....	15
<b>Figura 5.</b> Molde para obtenção da fibra em formato de U feito em impressora 3D .....	16
<b>Figura 6.</b> Fibra óptica plástica em formato de U com 5 cm de comprimento .....	16
<b>Figura 7.</b> Set up de leitura das amostras (b) com biossensor funcionalizado no suporte de acoplamento (a) .....	18
<b>Figura 8.</b> Processo de imunocaptura do biossensor .....	18
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do modo de leitura das amostras pelo set up do biossensor .....	19
<b>Figura 10.</b> Avaliação da sensibilidade da POF utilizada no sensor, não funcionalizada e funcionalizada com <i>Escherichia coli</i> aderida, frente a diferentes soluções de sacarose .....	22

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação dos biossensores de acordo com os elementos utilizados e seus princípios de funcionamento .....	5
<b>Tabela 2.</b> Aplicações dos biossensores de acordo com as áreas de atuação .....	7
<b>Tabela 3.</b> Relação entre o método de detecção da <i>Escherichia coli</i> em água e o tempo de análise .....	9
<b>Tabela 4.</b> Biossensores para detecção de <i>Escherichia coli</i> em água descritos na literatura atual .....	11
<b>Tabela 5.</b> Espécies bacterianas utilizadas no teste para verificação da especificidade do biossensor .....	20
<b>Tabela 6.</b> Índice de refração das soluções de sacarose .....	22
<b>Tabela 7.</b> Avaliação da especificidade do biossensor frente a diferentes microrganismos .....	23
<b>Tabela 8.</b> Determinação do limite de detecção do biossensor para detecção de <i>Escherichia coli</i> .....	24
<b>Tabela 9.</b> Comparação dos biossensores para detecção de <i>Escherichia coli</i> em água descritos na literatura atual com o biossensor de fibra óptica plástica (POF) .....	26

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
RESUMO PARA LEIGOS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Definição de biossensor .....	1
1.2 Propriedades dos biossensores .....	3
1.3 Classificações dos biossensores .....	4
1.4 Aplicações dos biossensores .....	6
1.5 <i>Escherichia coli</i> : características e detecção na avaliação da qualidade da água .....	8
1.6 Biossensores na detecção de <i>Escherichia coli</i> em água .....	10
1.7 Biossensores de fibra óptica plástica na detecção de <i>Escherichia coli</i> .....	11
2 JUSTIFICATIVA .....	13
3 OBJETIVOS .....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 Princípio físico de leitura .....	15
4.2 Sistema eletrônico de leitura e aquisição de dados .....	16
4.3 Produção de fibras ópticas plásticas em formato de U .....	16
4.4 Funcionalização das fibras ópticas em formato de U - imobilização dos anticorpos .....	17
4.5 Estirpe microbiana .....	18
4.6 Fixação dos microrganismos no biossensor .....	18
4.7 Modo de leitura das amostras .....	20
4.8 Avaliação da sensibilidade da fibra óptica plástica .....	20
4.8.1 Avaliação da sensibilidade da fibra óptica plástica não funcionalizada .....	21
4.8.2 Avaliação da sensibilidade da fibra óptica plástica funcionalizada e com <i>Escherichia coli</i> aderida .....	21
4.9 Avaliação da especificidade do biossensor .....	21
4.10 Determinação do limite de detecção do biossensor frente a suspensões bacterianas com diferentes concentrações .....	22
5 RESULTADOS .....	23
5.1 Avaliação da sensibilidade da fibra óptica .....	23
5.2 Avaliação da especificidade do biossensor .....	24
5.3 Determinação do limite de detecção do biossensor .....	24
6 DISCUSSÃO .....	26
7 CONCLUSÕES .....	30
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

## 1 Introdução

### 1.1. Definição de biossensor

Biossensores são dispositivos analíticos capazes de detectar a presença de um analito específico no meio de interesse, transformando o sinal biológico obtido através das moléculas alvo aderidas ao sensor, em um sinal elétrico, o qual é traduzido em uma medida analiticamente quantificável (Chadha *et al.*, 2022; Samuel e Rao, 2022).

Esses dispositivos possuem grande importância no cenário atual na pesquisa e diagnóstico, uma vez que permitem a obtenção de resultados das análises com maior velocidade, adequada especificidade e sensibilidade, sem a necessidade da utilização de laboratórios, equipamentos especializados e pessoal treinado. Tais características têm influência na qualidade de vida da população, que passa a poder monitorar indicadores de sua saúde em qualquer ambiente e rapidamente tomar medidas corretivas em caso de não conformidades, evitando assim danos graves à saúde. O mesmo se aplica ao monitoramento ambiental.

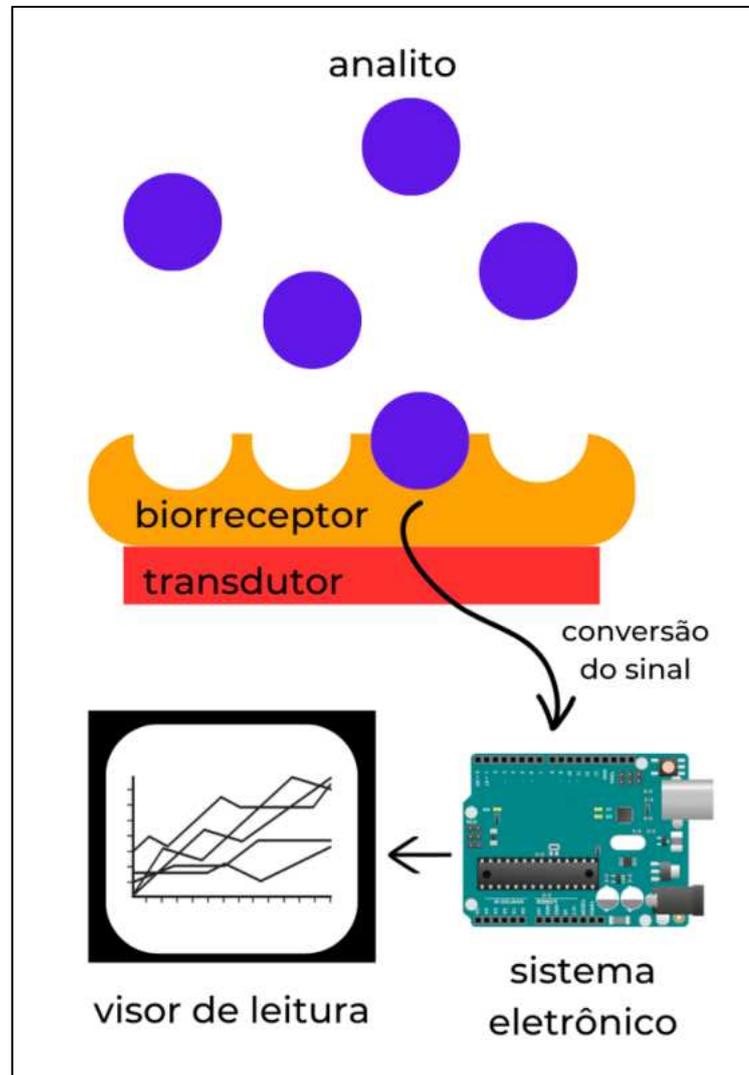
Os sensores são compostos de 5 elementos básicos, sendo eles o analito, biorreceptor, transdutor, sistema eletrônico e visor de leitura (Haleem *et al.*, 2021).

O biorreceptor consiste em uma biomolécula de reconhecimento que interage de maneira específica com a molécula alvo, responsável por converter o analito em um produto mensurável capaz de ser lido pelo sistema sensorial (Chada *et al.*, 2022). Este pode ser caracterizado por um ácido nucleico, enzimas, anticorpos, células, microrganismos, tecidos, dentre outros. A adesão do biorreceptor na superfície do sensor ocorre por meio de técnicas de imobilização ou de adsorção, como ligação covalente, micro-encapsulamento e ligação cruzada (Velusamy *et al.*, 2022).

O transdutor, por sua vez, é o responsável por converter o sinal biológico, obtido da amostra na forma de medidas físicas, como massa e carga, em um sinal elétrico, como voltagem, podendo ser de caráter eletroquímico, piezoelétrico, óptico ou calorimétrico (Wadhera *et al.*, 2019; Velusamy *et al.*, 2022).

Em seguida, o sinal elétrico gerado é capaz de ser lido pelo sistema eletrônico - circuito elétrico - cuja função é amplificar e processar o mesmo em medidas analíticas quantificáveis e em formato legível (Wadhera *et al.*, 2019; Velusamy *et al.*, 2022). A informação gerada pelo sistema eletrônico do biossensor poderá então ser digitalizada e exibida no visor de leitura (Wadhera *et al.*, 2019). Existem diversos tipos de displays utilizados nos sensores

comercializados, como computadores ou *liquid crystal display* (LCD), que irão variar de acordo com a forma em que a informação é processada e liberada, podendo ser de caráter numérico, tabelas, gráficos ou imagens (Velusamy *et al*, 2022).



**Figura 1** - Representação esquemática do funcionamento dos componentes do biossensor.

## 1.2. Propriedades dos biossensores

Os biossensores possuem 6 principais propriedades de funcionamento, caracterizadas nas suas especificidade, sensibilidade, linearidade, reprodutibilidade, estabilidade e reuso (Velusamy *et al*, 2022).

A especificidade determina o tipo de biorreceptor utilizado no sensor, que deve ser específico para o analito alvo, muitas vezes presente em um meio com diferentes moléculas, espécies, microrganismos e/ou contaminantes indesejáveis. A baixa especificidade de um

sensor pode levar a um resultado falso positivo, cuja ocorrência é devido ao reconhecimento de outras moléculas diferentes do analito alvo, presentes na amostra (Chada *et al*, 2022; Velusamy *et al*, 2022).

A sensibilidade é tida como a relação entre a intensidade do sinal elétrico gerado e as concentrações do analito na amostra. Quanto melhor for a resposta do biossensor em menores concentrações amostrais, maior a sua sensibilidade. Além disso, a sensibilidade de um biossensor pode ser determinada baseada em limites máximos e mínimos de detecção, de acordo com a concentração do analito de interesse na amostra (Chada *et al*, 2022).

A linearidade de um biossensor diz respeito à obtenção de um resultado - proveniente do sinal elétrico gerado - ser diretamente proporcional à concentração da molécula alvo na amostra, dependendo da resolução do sensor e da concentração do analito. Essa propriedade pode ser determinada por meio da equação matemática  $y = mx + c$ , na qual “y” é o sinal gerado, “m” é a sensibilidade, e “c” é a concentração do analito. Quanto maior a linearidade, melhor será a detecção de amostras com altas concentrações de analito (Velusamy *et al*, 2022).

Reprodutibilidade consiste na produção de vários sensores idênticos que serão capazes de gerar resultados concordantes quando realizar a medição de amostras com a mesma concentração do analito de interesse (Chada *et al*, 2022; Velusamy *et al*, 2022).

A estabilidade de um biossensor é importante para aplicações que requerem um monitoramento contínuo da amostra, dependendo de fatores como a afinidade do biorreceptor e a degradação dos mesmos com o tempo (Chada *et al*, 2022). Esta pode ser definida como a capacidade do sensor de suportar modificações dentro e fora do sistema bio sensorial. A falta ou baixa estabilidade de um biossensor pode causar erros nas medições, afetando a precisão do mesmo (Velusamy *et al*, 2022).

Alguns sensores podem, ainda, serem reutilizados, dependendo da sua aplicação. Essa propriedade é definida pela habilidade de um biossensor ser usado diversas vezes, garantindo a confiabilidade na obtenção dos resultados em todas as análises. O reuso irá depender da interação do analito com o biorreceptor, que deve ser reversível, deixando o sítio de ligação livre para uma nova análise. A dissociação do analito com o biorreceptor pode ocorrer de forma natural ou com o uso de solventes (Velusamy *et al*, 2022).

Dentro dessa perspectiva, a avaliação das propriedades do sensor, individualmente e como um todo, são necessárias para conferir a precisão dos biossensores para cada aplicação, determinando a sua confiabilidade (Thévenot *et al*, 2001).

### 1.3. Classificações dos biossensores

Os biossensores podem utilizar diferentes elementos biológicos de reconhecimento, transdutores, e ter diferentes analitos como molécula alvo (Chada *et al*, 2022). Sua caracterização pode ser feita, principalmente, analisando o tipo de transdutor utilizado, possuindo diferentes princípios físicos de transdução do sinal biológico em sinal elétrico. Nessa perspectiva, os biossensores são divididos em ópticos, piezoelétricos ou baseados em massa, calorimétricos e eletroquímicos (Huang, Zhu e Kianfar, 2021; Amaral *et al*, 2022).

Outro modo de classificação dos biossensores é dividindo-os em *label-free* e *labeled*, que diz respeito ao método de detecção utilizado pelo dispositivo (Chada *et al*, 2022). Biossensores *label-free* baseiam-se nas modificações que ocorrem no biorreceptor, como mudanças no índice de refração ou no peso, envolvendo diretamente a interação do sistema de transdução com o analito (Chada *et al*, 2022). Os biossensores classificados como *labeled*, por sua vez, utilizam um método de detecção dependente de um composto externo ligado a molécula alvo, como fluoróforo ou nanopartículas, cujo funcionamento necessita da marcação das propriedades desse composto, podendo adicionar uma etapa supletória no processo (Chada *et al*, 2022).

Os biossensores podem, ainda, ser classificados de acordo com o bioreceptor utilizado, classificando-os em biossensores catalíticos e biossensores de afinidade (Naresh e Lee, 2021). Os biossensores catalíticos possuem enzimas imobilizadas na superfície do transdutor, e o sinal gerado pelo sistema eletrônico irá depender dos produtos gerados na reação enzimática e a adesão dos mesmos na superfície do tradutor (Singh *et al*, 2021). Já os biossensores por afinidade são aqueles em que o biorreceptor imobilizado é uma biomolécula capaz de detectar o analito através de uma interação receptor-ligante específica, sendo eles os imunossensores, os baseados em ácidos nucleicos ou aptâmeros, e os baseados em microrganismos ou células inteiras (Naresh e Lee, 2021; Singh *et al*, 2023).

Na Tabela 1, é possível visualizar todas as classificações dos biossensores de acordo com os parâmetros mencionados.

**Tabela 1** - Classificação dos biossensores de acordo com os elementos utilizados e seus princípios de funcionamento.

Classificação	Parâmetro de classificação	Princípios de funcionamento	Subclassificações	Referência
Óptico	Transdutor	Mudanças em propriedades ópticas	Fibra óptica; Ressonador de anel óptico; Interferômetro; Guia de ondas ópticas; Ressonância de plasmon de superfície (SPR); Fluorescência e/ou luminescência; Cristal fotônico	Huang, Zhu e Kianfar, 2021; Amaral et al, 2022; Singh et al, 2023
Calorimétrico	Transdutor	Monitoramento de mudanças termostáticas de caráter endotérmico ou exotérmico	Não se aplica	Amaral et al, 2022; Velusamy et al, 2022
Eletroquímico	Transdutor	Variação de potencial e corrente gerada devido a movimentação de elétrons causada pela interação analito-eletrodo	Amperométrico; Potenciométrico; Condutimétrico; Impedimétrico	Huang, Zhu e Kianfar, 2021; Amaral et al, 2022
Piezoelétrico	Transdutor	Mudança da massa do analito através da aplicação de uma força mecânica	Não se aplica	Velusamy <i>et al</i> , 2022
Enzimático ou catalítico	Biorreceptor	Dependente dos produtos gerados na reação catalítica e de sua adsorção no biossensor	Não se aplica	Naresh e Lee, 2021; Singh <i>et al</i> , 2021
Imunossensor	Biorreceptor	Mudanças causadas pelo complexo antígeno-anticorpo	<i>labeled</i> ou <i>label-free</i>	Naresh e Lee, 2021
Baseado em células inteiras ou microrganismos	Biorreceptor	Mudanças causadas pela interação das células com diferentes tipos de analitos	Não se aplica	Naresh e Lee, 2021

Baseado em ácidos nucleicos ou aptâmeros	Biorreceptor	Mudanças químicas causadas pela interação do ácido nucleico ou aptâmero com o analito	Não se aplica	Naresh e Lee, 2021
<i>Labelled</i>	Método de detecção do analito	Dependente de um composto externo, como fluoróforos ou nanopartículas	Não se aplica	Chada <i>et al</i> , 2022
<i>Label-free</i>	Método de detecção do analito	Mudanças que ocorrem no biorreceptor através da interação direta do analito com o transdutor	Não se aplica	Chada <i>et al</i> , 2022

#### 1.4. Aplicações dos biossensores

A primeira descrição de um biossensor foi feita por Clark e Lyons em 1962. Estes autores desenvolveram um biossensor enzimático para a quantificação da glicose no sangue baseado na detecção da glucose oxidase, permitindo diagnosticar pacientes diabéticos de forma imediata, sensível, específica, e sem a necessidade de um pré-tratamento da amostra (APUD: Chada *et al*, 2022).

Nos dias atuais, biossensores têm sido aplicados em áreas como a indústria alimentícia, biomédica e meio ambiente. Suas aplicações podem variar de acordo com o transdutor aplicado no dispositivo, ou o tipo de biorreceptor utilizado.

Na cadeia de produção de alimentos, os biossensores podem ser empregados na avaliação de compostos químicos e biológicos para garantia da qualidade de alimentos e água, além da avaliação de resíduos de drogas veterinárias em animais destinados para o abate (Oliveira e Pereira, 2016). Os biossensores também possuem aplicação no meio ambiente, sobretudo, para detecção de poluentes em corpos d'água, solo e ar (Wanjari *et al*, 2022).

Biossensores utilizados na área medicinal atuam na detecção de patógenos e bioelementos, e no diagnóstico de doenças (Singh *et al*, 2021). Outro modo de atuação é na avaliação da progressão de doenças, sendo capaz de medir temperatura corporal, pressão e biomarcadores (Mohankumar *et al*, 2021).

Alguns exemplos de aplicações de biossensores podem ser visualizados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Aplicações dos biossensores de acordo com as áreas de atuação.

Área	Aplicações	Exemplo	Referência
Indústria alimentícia	Compostos químicos (componentes naturais, aditivos alimentares, pesticidas) e Compostos biológicos (microrganismos e toxinas)	Detecção de glicose em alimentos; Detecção de toxina colérica em alimentos	Oliveira e Pereira, 2016
Campo biomédico	Diagnóstico de doenças; monitoramento de aspectos fisiológicos; avaliação da progressão de doenças	Detecção da glicose no sangue, Diagnóstico de doenças cardiovasculares; Diagnóstico de câncer	Oliveira e Pereira, 2016; Mohankumar <i>et al</i> , 2021; Singh <i>et al</i> , 2021
Meio ambiente	Detecção de poluentes químicos e biológicos na água, solo ou ar	Detecção de pesticidas em água e plantas; detecção de microrganismos em água; avaliação da toxicidade do ar através da detecção de gases tóxicos	Eltzov <i>et al</i> , 2011; Wanjari <i>et al</i> , 2022; Domínguez <i>et al</i> , 2023
Pecuária	Resíduos de drogas veterinárias em animais destinados ao abate	Detecção de hormônios esteróides; diagnóstico de mastite bovina	Oliveira e Pereira, 2016

No que diz respeito à avaliação da qualidade microbiológica da água, os biossensores podem ser empregados para a detecção de microrganismos indicadores de condições sanitárias (MICS), que são utilizados para avaliação do estado da água quanto a presença de patógenos (Machado *et al*, 2021). Dentre os MICS está o grupo dos coliformes fecais, composto principalmente pela *Escherichia coli* (Machado *et al*, 2021). Atualmente existem diversas metodologias para a detecção deste microrganismo em água, porém ainda considerados demorados em comparação com a necessidade da obtenção dos resultados e com o tempo de análise realizado pelos biossensores.

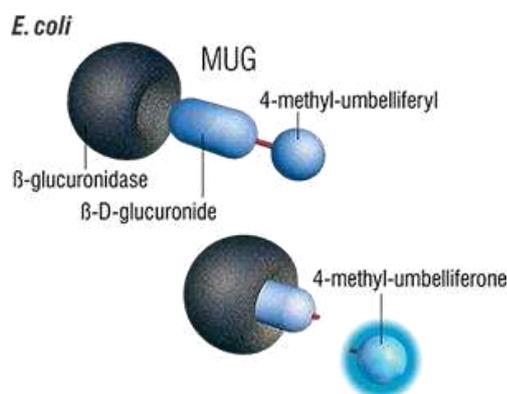
### 1.5. *Escherichia coli*: características e detecção na avaliação da qualidade da água

*Escherichia coli* é um bastonete Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae que faz parte da microbiota anfibiótica intestinal de humanos e animais de sangue quente. O microrganismo, quando portador de fatores de patogenicidade, é associado a infecções gastrointestinais, marcadas principalmente pela diarreia, além de infecções no trato urinário.

O método convencional de detecção e quantificação de *Escherichia coli* em água consiste na Técnica de Múltiplos Tubos, também chamada de técnica do Número Mais Provável (NMP), a qual se baseia na inoculação da amostra, diluída em diferentes concentrações, em séries de tubos de ensaio contendo o meio de cultivo adequado, e permite estipular o número mais provável de microrganismos presentes em uma amostra em até 96 horas (APHA, 2017; Leal e Vieira, 2015). Nesse método são utilizados meios de cultivo seletivos, como o Caldo Lauril Sulfato Triptose, Caldo Verde Brilhante Bile e o Caldo EC (Leal e Vieira, 2015).

Outro método convencional de detecção de *E. coli* em água é por meio da técnica de filtração em membrana, onde uma amostra do líquido é filtrada por uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 $\mu$ m, sendo posteriormente transferida para a superfície de um meio de cultura seletivo e indicador. Este método tem como vantagem a possibilidade de análise de um grande volume de líquido, o que aumenta o limite de detecção. Entretanto, possui limitações quanto a águas com alta turbidez e elevada quantidade de bactérias não coliformes. A presença de material particulado ou de muitas bactérias heterotróficas pode dificultar a filtração (APHA, 2017).

Atualmente, têm sido utilizados os meios de cultivo fluorogênicos e cromogênicos, como o Colilert<sup>®</sup>, que demandam 24 horas para a obtenção dos resultados, também sendo considerados métodos rápidos de detecção, sem a necessidade de testes confirmatórios (Marquezi, Gallo e Dias, 2010; Leal e Vieira, 2015). Tais meios possuem em sua composição o substrato fluorogênico 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucurônico (MUG), que é clivado pela enzima  $\beta$ -glucuronidase produzida pela *E. coli*, gerando um produto fluorescente que pode ser visto a olho nu em comprimento de onda (366 nm) ultravioleta, indicando a presença do microrganismo na amostra, fenômeno representado na Figura 4 (Leal e Vieira, 2015).



**Figura 2** - Princípio de funcionamento do meio Colilert para detecção de *Escherichia coli*. Fonte: <https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert/>.

Outro método de detecção de *Escherichia coli* é a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - polymerase chain reaction), que pode ser realizada dependente ou não dependente de métodos de cultivo, além de não requerer posteriores etapas confirmatórias, possuindo alta sensibilidade e especificidade, demandando de 3 a 24 horas para obtenção dos resultados (Heijnen e Medema, 2006; Silva e Domingues, 2015; Nascimento e Van Der Sand, 2018). Entretanto, em análises para o monitoramento da qualidade da água, é necessária uma etapa de pré-enriquecimento da amostra através do cultivo da mesma em meios de cultura seletivos, aumentando o tempo de análise em mais 24 horas (Silva e Domingues, 2015).

A tabela 3 apresenta os métodos de detecção de *E. coli* mais utilizados e seus tempos de análise.

**Tabela 3** - Relação entre o método de detecção da *Escherichia coli* em água e o tempo de análise.

Métodos de detecção	Tempo de análise	Referência
Número Mais Provável (NMP)	96 horas	Leal e Vieira, 2015
Filtração em membrana	24 horas	APHA, 2017
Meios fluorogênicos e cromogênicos (ex.: colilert)	24 horas	Marquezi, Gallo e Dias, 2010
Reação em cadeia da polimerase (PCR)	3 a 24 horas	Silva e Domingues, 2015

Nas últimas décadas, estudos quanto ao desenvolvimento de biossensores vêm crescendo, tendo potencial para substituir os métodos convencionais de análise laboratorial (Wandermur *et al*, 2014).

#### 1.6. Biossensores na detecção de *Escherichia coli* em água

Alguns biossensores já foram estudados com o objetivo de detectar *E. coli* (Tabela 4), principalmente imunossensores, além dos baseados em aptâmeros, ácidos nucleicos, peptídeos antimicrobianos, polímeros impressos, ou papel (Huang *et al*, 2022). Entretanto, os estudos para desenvolvimento desses biossensores ainda estão no estágio inicial, inviabilizando, no momento, a comercialização e seu emprego com a mesma frequência dos métodos convencionais já utilizados (Huang *et al*, 2022).

Eksi *et al* (2014) descreveram um imunossensor eletroquímico baseado em nanopartículas bimetálicas acopladas a anticorpos com capacidade de detecção em amostras com concentrações de no mínimo 3 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), demandando 96 minutos de análise. Entretanto, a incorporação de nanopartículas durante a produção deste biossensor aumenta significativamente o custo de produção, tornando-o inviável comercialmente com a tecnologia disponível atualmente. Em outro estudo, Costa (2022) retrata um biossensor eletroquímico baseado em um eletrodo de prata (Ag) com a incorporação de nanopartículas capaz de detectar células de *E. coli* em amostras com no mínimo  $10^3$  UFC/mL em 15 minutos.

No estudo realizado por Amaya *et al* (2019) foi desenvolvido um biossensor baseado em aptâmeros conjugado com complexos de nanopartículas de ouro para a detecção específica de *E. coli* O157:H7 dentro de 20 minutos, com limite de detecção de  $10^2$  UFC/mL. Já o estudo de Gambino *et al* (2022) mostra um biossensor produzido com arranjos de eletrodos interdigitados, que consegue detectar concentrações de no mínimo  $10^3$  UFC/mL. A equipe não especificou o tempo de análise necessário para o funcionamento desse biossensor.

**Tabela 4** - Biossensores para detecção de *Escherichia coli* em água descritos na literatura atual.

Biossensor	Sensibilidade	Tempo de detecção	Referência
Imunossensor eletroquímico baseado em nanopartículas bimetálicas	3 UFC/mL*	96 minutos	Eksi <i>et al</i> (2014)
Biossensor eletroquímico baseado em eletrodos de prata (Ag) com incorporação de nanopartículas	1000 UFC/mL	15 minutos	Costa (2022)
Biossensor baseado em aptâmeros conjugado com nanopartículas de ouro	100 UFC/mL	20 minutos	Amaya <i>et al</i> (2019)
Biossensor com arranjos de eletrodos interdigitados	1000 UFC/mL	Não definido	Gambino <i>et al</i> (2022)

\*UFC/mL: Unidade Formadora de Colônia por mililitro.

Apesar de existirem diversos estudos sobre o desenvolvimento de um biossensor para detecção de *Escherichia coli* em água, problemas relacionados à reprodutibilidade, padronização e produção em escala industrial continuam sendo fatores que impedem a sua comercialização. Desse modo, existe atualmente a necessidade do desenvolvimento de um dispositivo com potencial comercial cuja metodologia de produção apresente reprodutibilidade e praticidade na execução.

#### 1.7. Biossensores de fibra óptica plástica na detecção de *Escherichia coli*

Os biossensores ópticos são os dispositivos sensoriais mais reportados na literatura atual, oferecendo vantagens em comparação com outros métodos de análise, como o baixo custo e a possibilidade de miniaturização do dispositivo (Damborsky *et al.*, 2016). Dentre os biossensores ópticos estão os biossensores de fibra óptica que utilizam guias de onda interferométricas para obtenção dos resultados, produzindo um sinal elétrico cuja a variação é proporcional ao índice de refração do meio externo, o que possui relação com a concentração do analito na amostra (Damborsky *et al.*, 2016).

Existem dois tipos de biossensores baseados em fibra óptica, sendo eles os sensores de fibra óptica de sílica e os sensores de fibra óptica plástica, feitos com polimetilmetacrilato (PMMA). A fibra óptica plástica é mais comumente utilizada na fabricação de biossensores por apresentar baixo custo de produção, e permitir diferentes formatações do dispositivo devido a sua maior flexibilidade (Chen *et al.*, 2019).

## 2 Justificativa

Atualmente, os métodos de detecção e quantificação de *Escherichia coli* necessitam de no mínimo 24 a 48 horas para obtenção dos resultados. Além disso, eles exigem equipamentos e pessoal especializados, como laboratórios e estrutura de biossegurança e descarte. Por outro lado, a crescente urgência na obtenção dos resultados tem aumentado a necessidade de métodos mais rápidos de detecção, uma vez que as condições microbiológicas das águas analisadas podem se alterar entre o momento da coleta e a obtenção dos resultados das análises, bem como há a falta da disponibilidade do tempo de análise antes do consumo ou utilização da água. Nessa perspectiva, é desejável a aplicação de uma metodologia que seja rápida, sensível, específica e de fácil realização para a detecção de microrganismos de interesse em saúde pública, sendo os biossensores os equipamentos que melhor se enquadram nestas características. Apesar do grande número de estudos e tentativas de desenvolvimento de um equipamento baseado em sensor para detecção de microrganismos, nenhum apresenta reprodutibilidade e praticidade na produção que viabilize sua comercialização.

Nos últimos anos, nossa equipe vem trabalhando nos fundamentos para o desenvolvimento de um imunossensor baseado em fibra óptica plástica - que têm sido mais utilizada devido a sua flexibilidade e resistência quando comparada com a fibra óptica de vidro - para a detecção de *Escherichia coli*. Acreditamos que os resultados obtidos até o momento possibilitem avanços que resultem em um produto comercial, uma vez que ele é de fácil construção e já apresentou, em estudos prévios, uma sensibilidade e tempo de resposta que permitem seu uso prático. Para avançar em direção a um produto com potencial de industrialização ainda é necessário calibrar sua leitura, a partir do entendimento dos padrões de adesão das células de *Escherichia coli*.

### 3 Objetivos

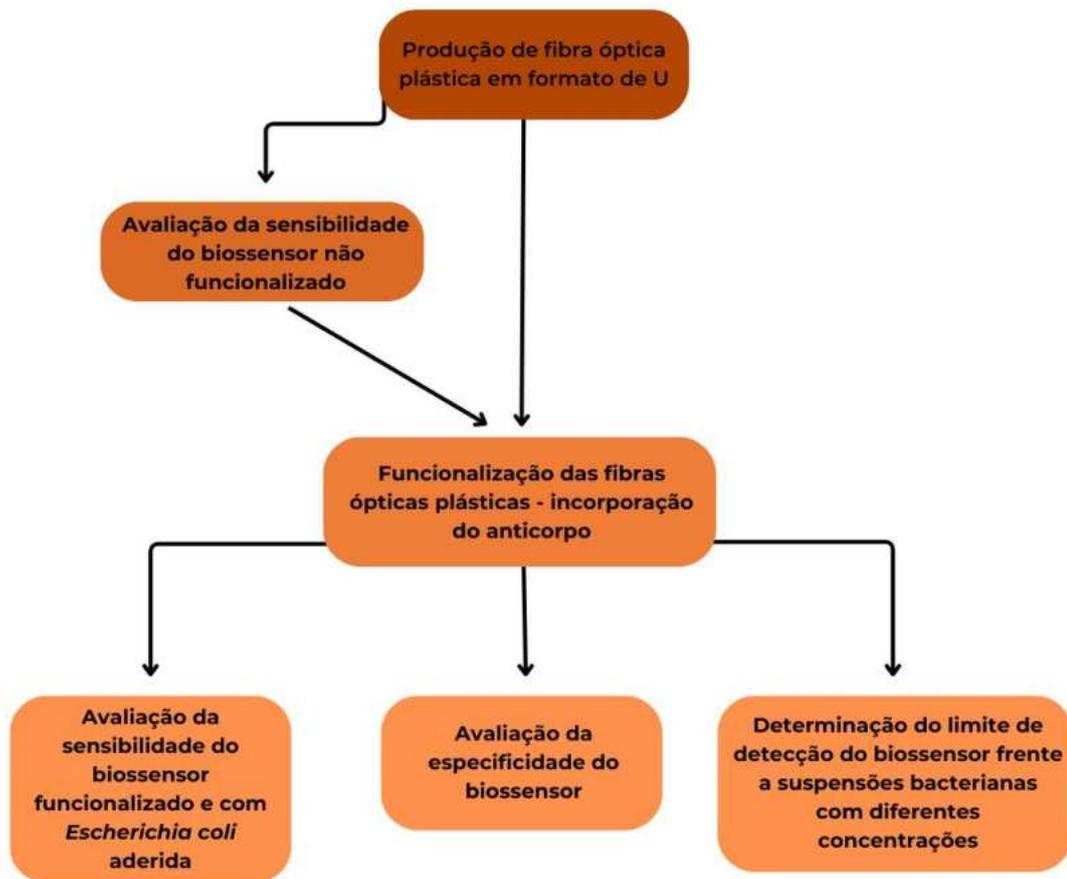
#### 3.1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a resposta de um imunossensor de fibra óptica plástica (POF) para a detecção específica e rápida de *Escherichia coli* em água.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade da fibra óptica plástica na detecção da variação do índice de refração do meio externo;
- Avaliar a especificidade do biossensor frente a diferentes estirpes de *Escherichia coli* e diferentes microrganismos Gram positivos e Gram negativos;
- Determinar o limite de detecção do biossensor frente a suspensões com diferentes concentrações de *Escherichia coli*.

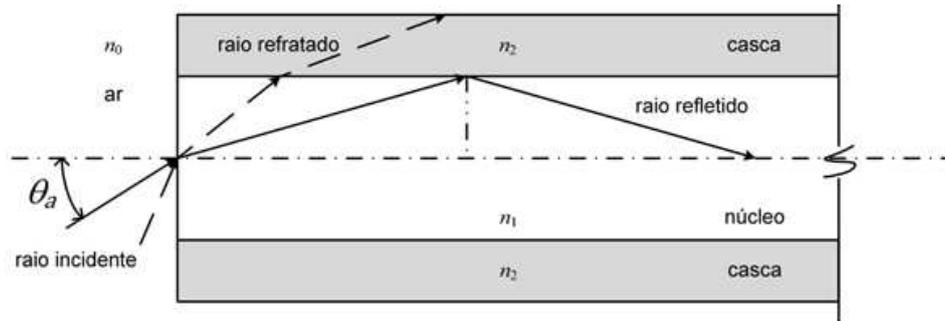
## 4 Metodologia



**Figura 3** - Fluxograma da metodologia do estudo.

### 4.1. Princípio físico de leitura

O princípio de funcionamento do biossensor consiste na interação da amostra biológica com o campo de leitura do biossensor, localizado na sua seção curvilínea, através da variação do índice de refração (IR) do meio externo em relação à fibra óptica plástica (POF). Desse modo, a leitura do biossensor é feita a partir da detecção dessa variação, uma vez que quanto maior for o índice de refração do meio externo, mais raios de luz serão refratados da POF ocasionando um maior escape de luz e conseqüentemente um menor valor de sinal de saída da luz captado pelo fotodetector. Isso acontece porque os raios de luz incidentes em uma fibra óptica não se propagam de maneira linear, levando ao encontro ocasional do raio de luz com a interface núcleo-casca, podendo este ser refletido de volta para o núcleo da fibra óptica ou refratado para o meio externo, como mostra a Figura 6. O índice de refração é a razão entre as velocidades da luz de dois meios distintos pelos quais ela se propaga, (Lopes *et al*, 2018).



**Figura 4** - Propagação dos raios de luz em uma fibra óptica. Fonte: IME 2018

\* $\theta_a$ : theta a. ângulo crítico do raio incidente.

Com o processo de imunocaptura do biossensor, realizado a partir da incubação do mesmo em suspensão bacteriana, o microrganismo aderido à superfície do biossensor passa a ser o novo meio externo em relação à fibra óptica plástica. Nessa perspectiva, levando-se em consideração que o IR da bactéria pura é de 1,39 enquanto o IR do ar é de 1, torna-se possível detectar a presença ou não da bactéria em uma amostra a partir da comparação da leitura do biossensor no ar antes e após a imunocaptura.

#### 4.2. Sistema eletrônico de leitura e aquisição de dados do biossensor

Para avaliação do índice de refração das fibras, foi utilizado um sistema na qual estão acoplados um diodo emissor de luz (LED) e um fotodiodo detector de modo que cada um fique direcionado a uma das extremidades do biossensor.

O conjunto do sistema LED e fotodiodo é alimentado por uma fonte de corrente. O sistema consiste em amplificadores de transimpedância simétricos (OPA 4140, Texas Instruments Inc.), com conversores A/D em um fundo de escala de 600 mV, resolução de 15 bits e um ruído total de aproximadamente 1 mV a 15mV.

#### 4.3. Produção de fibras ópticas plásticas em formato de U

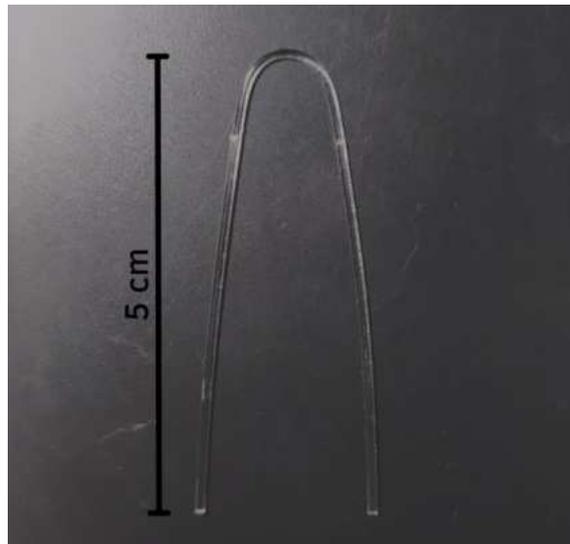
A fibra a ser utilizada no estudo é a Fibra Óptica com casca CK40 Eska Mitsubishi Rayon com 1 mm de espessura. Para a produção do biossensor, foi removida a casca de aproximadamente 1 cm do comprimento da fibra não moldada na sua região sensível - seção central - por fricção de um lenço de papel absorvente com acetona. Posteriormente, as fibras foram dobradas e moldadas em formato de U com o auxílio de um molde (Figura 7) feito sob

medida em impressora 3D (GTMax3D Core A3, Brasil) para obtenção de uma curvatura com raio de 5 mm, (Lopes *et al*, 2018).



**Figura 5** - Molde para obtenção da fibra em formato de U feito em impressora 3D. Foto autoral.

As fibras posicionadas no molde foram incubadas a 70 °C por 90 minutos, e em seguida mantidas a 25 °C por no mínimo 12 horas. Após este período, as pontas das fibras foram cortadas de modo que todas possuam 5 cm de comprimento e lixadas a fim de se obter lados simétricos, como visto na Figura 8.



**Figura 6** - Fibra óptica plástica em formato de U com 5 cm de comprimento. Foto autoral.

#### 4.4. Funcionalização das fibras em formato de U - imobilização dos anticorpos

O processo foi realizado segundo a metodologia descrita por Khnouf *et al.* (2016). As fibras foram submersas em álcool isopropílico 99% por 5 minutos para limpeza. Posteriormente elas foram lavadas com água ultrapura estéril e secas em temperatura ambiente. As fibras foram submetidas à hidrólise ácida, que consistiu na incubação em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95% (3:1) durante 15 minutos a 25 °C, e posteriormente a 60 °C por 2 horas, seguido de lavagem com água ultrapura estéril e secagem a 25 °C.

Com o intuito de realizar a aaminação da superfície da fibra, os sensores foram mergulhados em solução de polietilenoimina 0,2% (v/v) durante 24 horas a 25 °C. Após esse período, as fibras foram lavadas com água ultrapura estéril, secas em temperatura ambiente e submersas em solução Glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio pH 7,0, 0,1 M à 37 °C durante 24 horas, seguido de lavagem com tampão fosfato estéril e secagem por 18 horas a 37 °C.

Para garantir o direcionamento da ligação de anticorpos à fibra na sua porção Fc, deixando a porção Fab - região de interação com o antígeno - livre, foi feita a incubação do sensor em solução de proteína A estafilocócica (Sigma, EUA) a 0,05 mg/mL em solução salina de NaCl 0,85% pH 9,5 estéril por 1 hora a 30 °C. A proteína A estafilocócica se liga aos grupamentos de glutaraldeído da superfície da POF por ligação covalente.

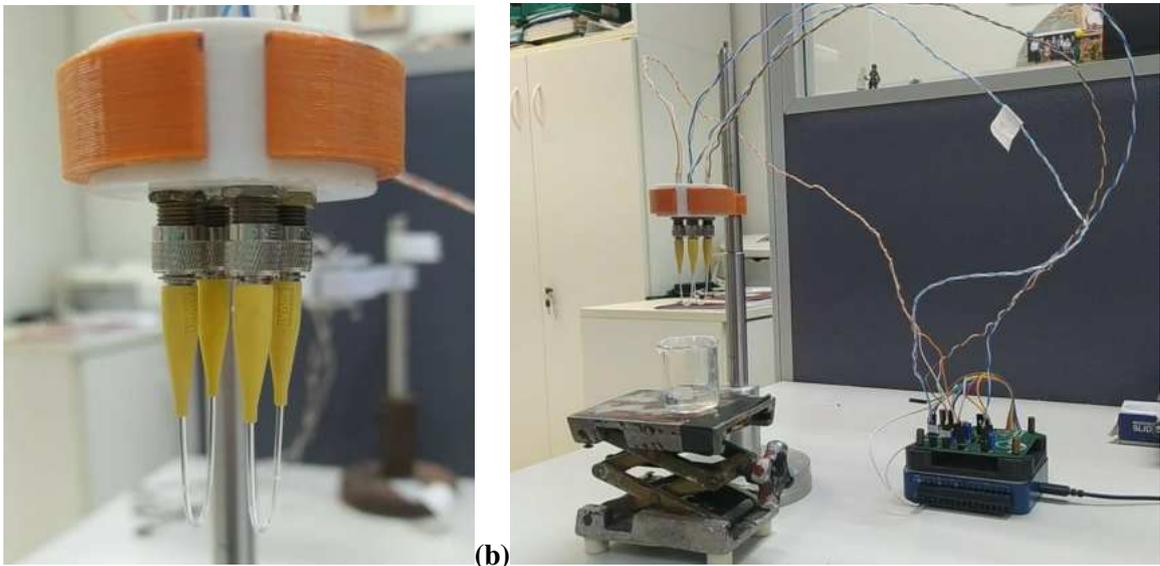
Por fim, os sensores foram incubados em solução de anticorpos anti *Escherichia coli* (Bio-rad, EUA) 0,1 mg/mL em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4, 0,01 M estéril durante 4 horas à 30 °C, depois lavados com solução tampão PBS. Os anticorpos se ligam às proteínas A imobilizadas na superfície da POF por ligação sítio específica na sua região Fc. Os anticorpos utilizados são Imunoglobulinas G policlonais de coelho que se aderem tanto aos antígenos somáticos O - compostos de complexos lipopolissacarídeos - quanto aos antígenos capsulares K - compostos de polissacarídeos ácidos, segundo a descrição do fabricante (Anexo A).

#### 4.5. Estirpe microbiana

O microrganismo a ser utilizado no estudo é a bactéria *Escherichia coli* ATCC 11229 pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A estirpe foi estocada a -25 °C em Caldo Triptona de Soja (TSB) com glicerol e a cultura de trabalho a 4 °C em meio Ágar Triptona de Soja (TSA).

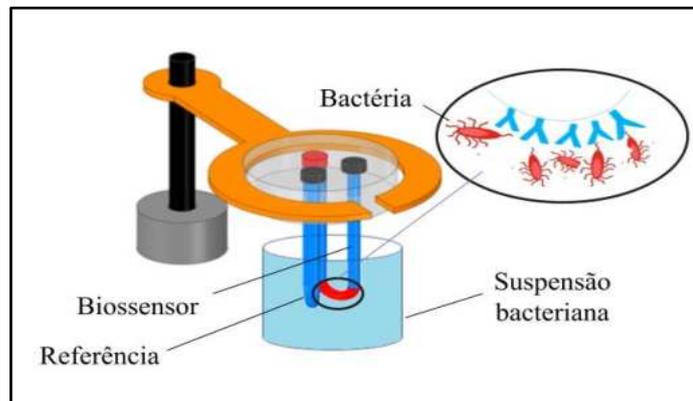
#### 4.6. Fixação dos microrganismos no biossensor

Os biossensores são acoplados em um suporte sobre uma bancada (Figura 9), onde são incubados por 10 minutos em uma suspensão contendo  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) de *Escherichia coli*, fenômeno denominado de imunocaptura. A suspensão bacteriana foi preparada a partir de uma cultura em meio TSA incubada à 37° C durante 24 horas. As células de uma colônia foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e comparada com a escala nefelométrica 0,5 de MacFarland.



**Figura 7** - Set up de leitura das amostras (b) com biossensor funcionalizado no suporte de acoplamento (a). Foto autoral.

A Figura 10 mostra a representação do processo de imunocaptura realizado pelo biossensor, o qual ocorre na seção curvilínea da fibra óptica plástica, que também é a região sensível e de leitura do biossensor.

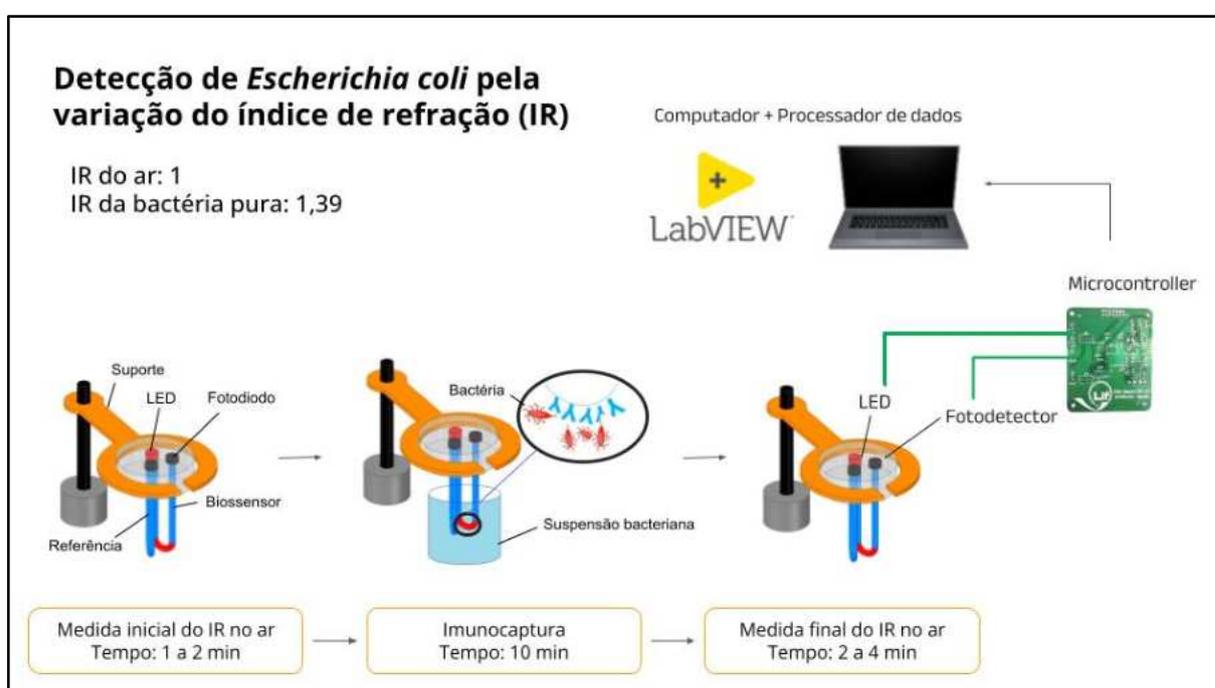


**Figura 8** - Processo de imunocaptura do biossensor. Foto autoral.

#### 4.7. Modo de leitura das amostras

A leitura das amostras é realizada a partir da medição do valor de amplitude do sinal de saída da luz da fibra óptica plástica no ar de 1 a 2 minutos, seguido da medição na suspensão bacteriana durante 10 minutos e por fim no ar de 2 a 4 minutos, como representado na Figura 11.

São considerados resultados positivos biossensores que apresentam queda de no mínimo 0,1 milivolts (mV) do valor de amplitude do sinal de saída da luz após incubação na amostra quando comparado com o valor de amplitude inicial, ou seja, previamente ao processo de imunocaptura do biossensor.



**Figura 9** - Representação esquemática do modo de leitura das amostras pelo set up do biossensor. Foto autoral.

#### 4.8. Avaliação da sensibilidade da fibra óptica plástica

Com o objetivo de testar a sensibilidade dos biossensores em detectar variações do índice de refração em diferentes meios externos a eles submetidos, foram realizados testes de leitura da POF em água e soluções de sacarose de 15, 25, 30, 45 e 52% (p/v) de concentração. O índice de refração de cada solução de sacarose foi avaliado com o uso de um refratrômetro ABBE digital de bancada Quimis, modelo Q76780. As leituras foram realizadas durante 2 minutos para cada meio externo utilizado.

#### 4.8.1. Avaliação da sensibilidade da fibra óptica plástica não funcionalizada

A fim de verificar a sensibilidade da fibra óptica plástica pura, o teste foi realizado com as fibras não funcionalizadas, ou seja, sem o anticorpo imobilizado. Foram utilizadas 10 amostras de biossensores para o teste.

#### 4.8.2. Avaliação da sensibilidade da fibra óptica plástica funcionalizada e com *Escherichia coli* aderida

Posteriormente, o teste de leitura do índice de refração foi repetido utilizando-se as mesmas fibras, porém já funcionalizadas e com *Escherichia coli* aderida à superfície do biossensor, utilizando uma suspensão de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). A imunocaptura foi realizada através da incubação dos biossensores na suspensão bacteriana durante 10 minutos, previamente à leitura do IR nos meios externos utilizados no teste.

#### 4.9. Avaliação da especificidade do biossensor

Para verificar a especificidade do biossensor em desenvolvimento, o sistema foi avaliado utilizando duas estirpes de *Escherichia coli*, sendo essas do ATCC 25922 (sorotipo O6, biotipo 1) e ATCC 35218 (sorotipo O6:H31:K). Da mesma forma, o teste foi realizado com outros microrganismos Gram negativos e Gram positivos pertencentes ou não à família da enterobactérias, conforme descrito na Tabela 5.

**Tabela 5** - Espécies bacterianas utilizadas para avaliação da especificidade do biossensor.

Microrganismos	Gram	Referência
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo	ATCC 13883
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	ATCC 15442
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo	ATCC 25923
<i>Bacillus cereus</i>	Positivo	DMS F4433

A interpretação dos testes de especificidade foi realizada pela leitura dos biossensores através do seu sistema eletrônico. O teste foi realizado em triplicata para cada microrganismo.

#### 4.10. Determinação do limite de detecção do biossensor frente a suspensões bacterianas com diferentes concentrações

Com o intuito de determinar o limite de detecção do biossensor quanto a diferentes concentrações microbianas, foram realizados testes de leitura do imunossensor nas concentrações decimais de  $10^3$  a  $10^8$  UFC/mL.

Para tal, foram preparadas as suspensões bacterianas a partir de uma ressuspensão da colônia de trabalho em solução salina NaCl comparada com a escala nefelométrica 0,5 de MacFarland. A partir dessa primeira suspensão, foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina NaCl para obtenção das concentrações de  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  e  $10^3$  UFC/mL. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração avaliada.

## 5 Resultados

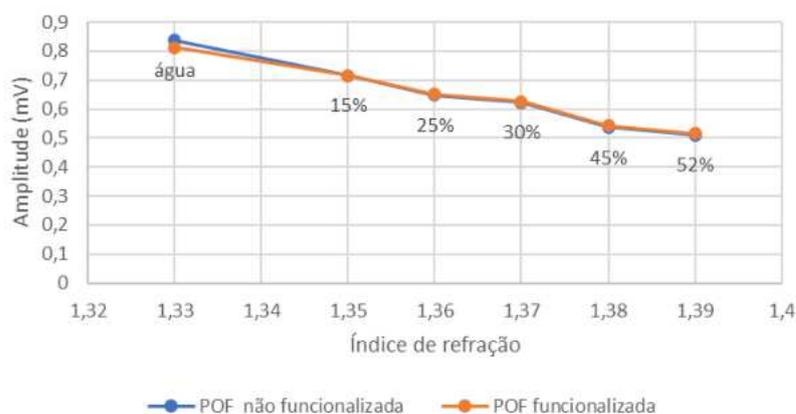
### 5.1. Avaliação da sensibilidade da fibra óptica plástica

O índice de refração obtido pelo refratômetro digital de cada solução de sacarose pode ser visualizado abaixo (Tabela 6).

**Tabela 6** - Índice de refração das soluções de sacarose.

Concentração (%) da solução de sacarose	Índice de refração
Água (controle)	1,33
15	1,35
25	1,36
30	1,37
45	1,38
52	1,39

A partir dos resultados obtidos das 10 POFs utilizadas, foi obtida a média aritmética, gerando um único valor para cada meio externo utilizado. Na interpretação da leitura do índice de refração para a POF não funcionalizada e POF funcionalizada com *Escherichia coli* aderida foi obtida uma queda do valor de amplitude do sinal de saída da luz entre 0,03 a 0,1 mV como resposta ao aumento do índice de refração de cada meio externo testado (Figura 12).



**Figura 10** - Avaliação da sensibilidade da POF utilizada no sensor, não funcionalizada e funcionalizada com *Escherichia coli* aderida, frente a diferentes soluções de sacarose. mV: milivolts; 15, 25, 30, 45 e 53% de sacarose em solução.

## 5.2. Avaliação da especificidade do biossensor

Em relação a avaliação da especificidade do biossensor frente a diferentes sorotipos de *Escherichia coli* (O6 biotipo 1 e O6:H31:K), todos os biossensores testados foram capazes de detectar a presença de bactérias nas amostras. A partir das leituras das triplicatas, foi calculada a média aritmética dos resultados obtidos, resultando em uma queda média do sinal de saída da luz de 0,2 mV para o sorotipo O6 biotipo 1, e 0,3 mV para o sorotipo O6:H31:K (Tabela 7). Foi detectada uma diferença de 0,1 mV entre os sorotipos testados.

Quanto à avaliação da especificidade do biossensor frente a microrganismos pertencentes a gêneros diferentes de *Escherichia coli*, apenas *Klebsiella pneumoniae* foi capaz de gerar alguma resposta do sensor (Tabela 7), com uma média da triplicata de 0,03 mV. Os demais microrganismos testados obtiveram uma média de resposta de 0 mV entre as triplicatas, ou seja, não conseguiram gerar respostas do sensor (Tabela 7).

**Tabela 7** - Avaliação da especificidade do biossensor frente a diferentes microrganismos.

<b>Microrganismo</b> ( $1,5 \times 10^8$ UFC/mL)	<b>Média das leituras</b> (mV)*
<i>E. coli</i> O6 biotipo 1	0,2
<i>E. coli</i> O6:H31:K	0,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Bacillus cereus</i>	0

mV: milivolts; UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro. Foram considerados como resultados positivos valores superiores a 0,1 mV.

Os gráficos dos resultados obtidos a partir da leitura de cada biossensor testado quanto a sua especificidade estão presentes no Anexo B.

## 5.3. Determinação do limite de detecção do biossensor

A Tabela 8 apresenta as médias aritméticas dos resultados obtidos nas leituras do valor de sinal de saída da luz após incubação dos biossensores em suspensões com diferentes

concentrações de *Escherichia coli*. O sensor foi capaz de detectar a presença de bactérias em concentração mínima de  $10^3$  UFC/mL. Este valor foi considerado o limite de detecção mínimo do biossensor.

**Tabela 8** - Determinação do limite de detecção do biossensor para detecção de *Escherichia coli*.

Concentração microbiana (UFC/mL)	Média das leituras (mV)
$10^8$	0,2
$10^7$	0,2
$10^6$	0,25
$10^5$	0,1
$10^4$	0,25
$10^3$	0,2

mV: milivolts; UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro. Foram considerados como resultados positivos valores superiores a 0,1 mV.

Com exceção da suspensão com  $10^5$  UFC/mL de concentração bacteriana, não foram observadas diferenças significativas entre os valores médios de detecção do sinal de saída da luz frente a diferentes concentrações bacterianas testadas (Tabela 8). A diferença entre a suspensão bacteriana com concentração de  $10^5$  UFC/mL com as demais concentrações testadas foi igual a 0,1 mV.

Os gráficos das leituras dos biossensores frente a diferentes concentrações de *Escherichia coli* estão presentes no Anexo C.

## 6 Discussão

Nos últimos anos, pesquisas quanto ao desenvolvimento de biossensores como métodos alternativos de diagnóstico e pesquisa têm crescido a fim de diminuir o tempo de análise atualmente requerido pelos métodos convencionais. No presente estudo, um biossensor para detecção de *Escherichia coli* em amostras de água foi avaliado quanto à sensibilidade e especificidade.

Em relação à aplicabilidade do sensor, todas as fibras ópticas testadas foram capazes de detectar as diferenças quanto ao índice de refração de água pura e soluções de sacarose em concentrações de 15, 25, 30, 45 e 52%. Esses resultados vão de encontro com os estudos prévios da equipe realizados por Lopes *et al* (2018), Rodrigues *et al* (2017) e Wandermur *et al* (2014), os quais demonstraram a capacidade da fibra óptica plástica em medir diferentes índices de refração externos ao biossensor a partir de soluções de sacarose, de modo que o valor de saída do sinal da luz apresentasse uma queda com o aumento contínuo do índice de refração, que variou de 1,33 a 1,39. Desse modo, levando em consideração que o IR da *E. coli* é de 1,39 e o IR da água é de 1,33, foi possível demonstrar que o biossensor é capaz de detectar células de *Escherichia coli* em uma amostra. A sensibilidade do biossensor em detectar a presença de bactérias em uma amostra pode ser confirmada pela capacidade do sistema em medir os diferentes índices de refração dos meios externos a ele submetidos.

Quando o sensor foi avaliado em diferentes concentrações bacterianas, o limite de detecção mínimo foi de  $10^3$  UFC/mL, dentro das concentrações testadas. O nível de sensibilidade encontrado no presente trabalho foi igual ao observado nos estudos de Costa (2022) e Gambino *et al* (2022), porém foi menor que o oferecido pelos biossensores descritos por Eksi *et al* (2014) e Amaya *et al* (2019) (Tabela 9). Ainda que a sensibilidade do biossensor avaliado tenha sido inferior a alguns outros descritos na literatura, este apresenta como vantagem o menor tempo para obtenção dos resultados, uma vez que outros podem chegar a mais de 1 hora de análise. Os resultados das leituras do biossensor foram obtidos após aproximadamente 15 minutos de leitura. A velocidade de resposta mostrou-se semelhante ao sensor desenvolvido por Costa (2022), que utilizou o mesmo tempo de detecção. Este resultado representa uma melhoria em relação aos dispositivos existentes atualmente e aos métodos convencionais, que demandam de 3 a 96 horas.

Em razão do biossensor em estudo não ter sido testado em amostras com concentrações menores a  $10^3$  UFC/mL, não é possível afirmar que o dispositivo não tem capacidade de detectar células de *E. coli* em concentrações mais baixas, sendo necessário a realização de

testes para avaliação da sua sensibilidade em amostras com concentrações menores que 1000 UFC/mL. O limite de detecção encontrado permite atualmente seu uso na avaliação da adequação à legislação microbiológica vigente (Instrução Normativa 161) para alguns alimentos como, hortaliças, raízes, tubérculos, fungos comestíveis, carne de aves, suína, cafés, chás, entre outros (ANVISA, 2022), que determinam que lotes com contagem de *E. coli* acima deste valor sejam considerados impróprios para o consumo humano.

**Tabela 9** - Comparação dos biossensores para detecção de *Escherichia coli* em água descritos na literatura atual com o biossensor de fibra óptica plástica (POF).

<b>Biossensor</b>	<b>Sensibilidade (UFC/mL)</b>	<b>Tempo de detecção (minutos)</b>	<b>Referência</b>
Imunossensor eletroquímico baseado em nanopartículas bimetálicas	3	96	Eksi <i>et al</i> (2014)
Biossensor eletroquímico baseado em eletrodos de prata (Au) com incorporação de nanopartículas	1000	15	Costa (2022)
Biossensor baseado em aptâmeros conjugado com nanopartículas de ouro	100	20	Amaya <i>et al</i> (2019)
Biossensor com arranjos de eletrodos interdigitados	1000	Não definido	Gambino <i>et al</i> (2022)
Biossensor de POF	1000	14 - 16	Estudo atual

UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro.

Os testes realizados com os sensores, tanto para a avaliação da sensibilidade quanto o limite de detecção mostraram pequenas diferenças entre as unidades testadas, mas não entre as médias dos diferentes lotes (dados não mostrados). Uma vez que a reprodutibilidade tem sido um dos principais fatores que fazem questionamento ao uso dos biossensores, estes

dados, ainda que preliminares, sugerem a aplicação dos testes em triplicata, de modo a aumentar a confiabilidade dos resultados. Além disso, pelo presente estudo ter um caráter preliminar, torna-se necessário a realização de mais testes com um maior número de repetições, além de um estudo estatístico avançado para uma determinação mais acurada da reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo dispositivo.

A média dos resultados obtidos na detecção de diferentes concentrações de *Escherichia coli* foi em sua maioria 0,2 mV, não refletindo as diferenças entre as concentrações microbianas, que em teoria, deveriam ser maiores nas maiores concentrações de microrganismos. Estes resultados sugerem que o biossensor em estudo é capaz de detectar a presença ou ausência de bactérias em uma determinada amostra, não relacionando os resultados com uma quantificação. Esta propriedade pode estar relacionada com o tempo de contato entre a amostra a ser analisada e o sensor, que pode resultar em uma saturação do sistema, ou seja: depósito cumulativo dos microrganismos na superfície da fibra. Um estudo mais aprofundado relacionando a acentuação da curva gerada pela queda do sinal com o tempo de contato será realizado posteriormente, de modo a tentar determinar a necessidade de redução do tempo de leitura do teste.

Para investigar a especificidade do sensor, foram utilizados microrganismos da família enterobacteriaceae e de outras famílias. Os microrganismos pertencentes à família enterobacteriaceae podem compartilhar antígenos semelhantes, o que, na teoria, ocasionaria em possíveis resultados falsos positivos, uma vez que o anticorpo escolhido para produção do biossensor pode reconhecer tais antígenos. Jann (1987) mostrou que algumas enterobactérias podem apresentar antígenos semelhantes ou idênticos entre si. Os antígenos capsulares K do grupo 1 de *Escherichia coli*, por exemplo, estão relacionados com antígenos capsulares de *Klebsiella pneumoniae*, enquanto que os antígenos K do grupo 2 de *E. coli* estão relacionados com antígenos capsulares de *Neisseria meningitidis* e de *Haemophilus influenzae*. Os antígenos somáticos O de *E. coli*, por sua vez, possuem relação com os antígenos O das demais enterobactérias por apresentarem semelhanças nas estruturas dos polissacarídeos que compõem esse antígeno.

De acordo com a descrição do fabricante (Anexo A), o anticorpo utilizado reconhece e se adere tanto em antígenos somáticos O quanto antígenos capsulares K, fato que pode resultar em reações cruzadas com outros microrganismos pertencentes à família enterobacteriaceae, como *Klebsiella pneumoniae*, que compartilha antígenos semelhantes ao de *Escherichia coli*. No presente estudo, todos os biossensores testados apresentaram resultados negativos para microrganismos diferentes de *E. coli*. Ainda que um sinal tenha sido detectado na presença de

*K. pneumoniae*, o teste foi considerado negativo uma vez que o valor detectado estava abaixo do valor mínimo considerado para um teste positivo. Estudos adicionais com um maior número de enterobactérias devem ser realizados, de modo a entender se outros gêneros ou espécies relacionadas com *E. coli* podem gerar resultados falso-positivos. Da mesma forma, a escolha de anticorpos monoclonais ou que sejam específicos para antígenos mais numerosos na superfície das células poderiam ser utilizados para aumentar a especificidade e a sensibilidade do sensor.

Devido à característica do processo de funcionalização do imunossensor, torna-se viável a utilização desse protocolo no desenvolvimento de biossensores para detecção de outros microrganismos por meio da troca do anticorpo imobilizado na superfície da fibra óptica plástica para um específico ao novo antígeno de interesse. Com isso, o dispositivo em estudo pode ser utilizado futuramente para diagnóstico de diferentes doenças de forma rápida, sensível e específica. Vale ressaltar que o aspecto dos resultados positivos pode variar para cada microrganismo, em razão de uma possível diferença no índice de refração entre eles devido a suas diferenças morfológicas.

Entre as principais falhas detectadas nos sensores durante o estudo, o erro no acoplamento da fibra óptica ao suporte de leitura do sistema sensorial, foi o mais comum. Esse erro gerou um mau acoplamento na interface entre as pontas finais da POF com o LED e/ou fotodetector, comprometendo a passagem da luz pelo comprimento do biossensor e consequentemente sua detecção pelo fotodetector. Com isso, esses biossensores apresentaram leituras errôneas, dado que o princípio físico do funcionamento do dispositivo baseia-se, principalmente, nas propriedades ópticas do sensor através da medição da quantidade de luz detectada pelo fotodetector em comparação com a luz emitida pelo LED. Uma medida corretiva para minimizar este problema está em andamento.

Este estudo avaliou a aplicabilidade de um biossensor para a detecção rápida de *Escherichia coli*. Os resultados obtidos servirão de base para estudos quanto ao aprimoramento do sensor, de modo ao desenvolvimento de um produto comercial.

## 7 Conclusões

A fibra óptica plástica utilizada na produção do biossensor mostrou boa sensibilidade na detecção da variação do índice de refração de diferentes meios externos a ela submetidos, demonstrando boa sensibilidade para detecção de *Escherichia coli*.

O uso dos testes em triplicata mostrou que as médias obtidas apresentaram uma reprodutibilidade que garantem a confiabilidade do sistema.

Os biossensores produzidos foram capazes de detectar seletivamente duas estirpes *Escherichia coli* pertencentes a dois diferentes sorotipos, mas não outros microrganismos, incluindo a enterobactéria *Klebsiella pneumoniae*, além de outros Gram-negativos e Gram-positivos. Esse fato mostra a especificidade do sistema montado.

Os biossensores foram capazes de detectar baixas concentrações de *Escherichia coli*, apresentando um limite de detecção mínimo de  $10^3$  UFC/mL, dentro das concentrações testadas, que permite atualmente seu uso como método de triagem no controle de alguns alimentos, conforme a legislação vigente.

O método de quantificação do sensor merece estudos complementares, uma vez que ele não foi capaz de distinguir a intensidade do sinal gerado por diferentes concentrações de *E. coli*.

## 5 Referências bibliográficas

- Amaral, Eduardo M. F.; Andrade, Jean C. B.; Freitas, Leandro B.; Teixeira, Gabriella T. L.; Nascimento, João P. L., Gelamo, Rogério V.; Leite, Natália B.; Moreto, Jérifeson A. (2022). Sensores eletroquímicos e biossensores: Seus princípios básicos de funcionamento e algumas aplicações. *Revista Virtual de Química*. <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/RVq130922-a3.pdf>
- Amaya, Susana Díaz; Lin, Li Kai; Deering, Amanda J.; Stanciu, Lia A. (2019). Aptamer-based biosensor for whole cell analytical detection of *E. coli* O157:H7. *Analytica Chimica Acta*, 1081, 146-156. [https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267019308360?casa\\_token=GdW5s1XiTyUAAAAA:9U0SW0MP1oi8QmjxWCUBqU6ns4Q32xdTxbjBCydyjKlfrJZ-rUl3K8zSg\\_r2svou2blif\\_l-ghOc](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267019308360?casa_token=GdW5s1XiTyUAAAAA:9U0SW0MP1oi8QmjxWCUBqU6ns4Q32xdTxbjBCydyjKlfrJZ-rUl3K8zSg_r2svou2blif_l-ghOc)
- ANVISA (2022). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN N° 161. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>
- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 23rd. Washington, DC: American Public Health Association; 2017. Part 9221 - 9222.
- Chadha, Utkarsh; Bhardwaj, Preetam; Agarwal, Rushali; Rawat, Priyanshi; Agarwal, Rishika; Gupta, Ishi; Panjwani, Mahek; Singh, Shambhavi; Ahuja, Chirag; Selvaraj, Senthil Kumaran; Banavoth, Murali; Sonar, Prashant; Badoni, Badrish; Chakravorty, Arghya (2022). Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 109, 21-51. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.010>.
- Chen, Y.; Liu, J.; Yang, Z.; Wilkinson, J. S.; Zhou, X. (2019). Optical biosensors based on refratometric sensing schemes: A review. *Biosensors and bioelectronics*, vol. 144. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566319307729>
- Costa, Leandro Araújo da (2022). Biossensor impedimétrico baseado em nanopartículas de CoFe2O4 acopladas a Concanavalina A para detecção de *E. coli*. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/68721>
- Damborsky, P.; Svitel, J.; Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, vol 6, 91-100. <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/60/1/91/78222/Optical-biosensors>
- Domínguez, Marcela Herrera; Luna, Gesuri Morales; Mahlknecht, Jurgen; Cheng, Quan; Hernández, Iris Aguilar; Soto, Nancy Ornelas (2023). Optical Biosensors and Their Applications for the Detection of Water Pollutants. *Biosensors*, 13, 370. <https://doi.org/10.3390/bios13030370>.
- Eksi, Haslet; Guzel, Remziye; Guven, Burcu; Boyaci, Ismail Hakki; Solak, Ali Osman (2014). Fabrication of an electrochemical *E. coli* biosensor in biowells using bimetallic nanoparticle-labelled antibodies. *Electroanalysis*, 27 (2). <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elan.201400370>
- Eltzov, Evgeni; Pavluchkov, Vladislav; Burstin, Matan; Marks, Robert S. (2011). Creation of a fiber optic based biosensor for air toxicity monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155, 859-867. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.01.062>.
- Fernandes, Luana Leal, Gois, Rosineide Vieira (2015). Avaliação das principais metodologias aplicadas às análises microbiológicas de água para consumo humano voltadas para detecção de coliformes totais e termotolerantes. *Revista Científica Da Faculdade De Educação E Meio Ambiente*, 6(2), 49-64. <https://revista.unifaema.edu.br/index.php/Revista-FAEMA/article/view/339>

Gambino, Alvaro Zazueta; Betanzo, Claudia Reyes; Fernández, Victor Manuel Jiménez (2022). Localized Capture of Bacteria in an Interdigitated Electrode Impedance Biosensor. Institute of Electrical and Electronics Engineers, Latin America Transactions, 20 (3), 402-408.

<https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/9667138/authors#authors>

Haleem, Abid; Javaid, Mohd; Singh, Ravi Pratap; Suman, Rajiv; Rab, Shanay (2021). Biosensors applications in medical field: A brief review. Sensors International, 2.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666351121000218>

Heijnen, Leo; Medema, Gertjan (2006). Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *J Water Health*, 4 (4), 487-498. <https://doi.org/10.2166/wh.2006.0032>

Huang, Xiaoping; Zhu, Yufang; Kianfar, Ehsan (2021). Nano biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques. *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1649-1672.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785421002751>

Huang, Ying; Su, Zhipeng; Li, Wang; Ren, Jiali (2022). Recent progresses on biosensors for *Escherichia coli* detection. *Food Analytical Methods*, 15, 338-366. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-021-02129-7>

Jann, K.; Jann, B. (1987). Polysaccharide antigens of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* 9 Suppl 5:S517-26.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2446369/>.

Khnouf, Ruba; Karasneh, Dina; Albiss, Borhan Aldeen (2016). Protein immobilization on the surface of polydimethylsiloxane and polymethyl methacrylate microfluidic devices. *Electrophoresis*, 37 (3).

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elps.201500333>

Lopes, Rafaella N.; Rodrigues, Domingos M.C.; Allil, Regina C.S.B.; Werneck, Marcelo M. (2018). Plastic optical fiber immunosensor for fast detection of sulfate-reducing bacteria. *Elsevier*, 128, 377-385.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224118303695>.

Machado, Rosana H. L.; Marinho, Luiz Felipe C.; Dworak, Elaine S.; Carolino, Idalina D. R.; Conegero, Celso I.; Massago, M. (2021). Água mineral comercializada no Brasil: caracterização, consumo e qualidade microbiológica. *Arquivos do Mudi*. 25(1):12-5. Disponível em:

<https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/56828>.

Marquezi, Marina Chiarelli; Gallo, Cláudio Rosa; Dias, Carlos Tadeu dos Santos (2010). Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. *Revista do Instituto Adolf Lutz*, 69 (3), 291-296. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-583081>

Mohankumar, P.; Ajayan, J.; Mohanraj, T.; Yasodharan, R. (2021). Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. *Measurement*, 167.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224120308332>

Naresh, Varnakavi; Lee, Nohyun (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, 21, 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.

Nascimento, Alessandra Mallmann; Van Der Sand, Sueli Teresinha (2018). O uso de PCR na detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica em amostras de água de esgoto. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35(2), 181-188.

<https://seer.ufrgs.br/index.php/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/15968>.

Oliveira, Ana Elisa F.; Pereira, Arnaldo César (2016). Biosensores e a indústria alimentar - Revisão. *Revista Virtual de Química*, 8 (5). <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1381>

Samuel, Vimala Rani; Rao, K.Jagajjanani (2022). A review on label free biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*: X, 11, 100216. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100216>.

Silva, Diana Mendes; Domingues, Lucília (2015). On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 400-411. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.015>.

Singh, Anoop; Sharma, Asha; Ahmed, Aamir; Sundramoorthy, Ashok K.; Furukawa, Hidemitsu; Arya, Sandeep; Khosla, Ajit (2021). Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors*, 11, 336. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>.

Singh, Amit Kumar; Mittal, Sweta; Das, Mangal; Saharia, Ankur; Tiwari, Manish (2023). Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal*, 67, 673-691. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110016822008249>

Thévenot, Daniel R.; Toth, Klara; Durst, Richard A.; Wilson, George S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121-131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4).

Velusamy, Karthik; Periyasamy, Selvakumar; Kumar, P. Senthil; Rangasamy, Gayathri; Pauline, J. Mercy Nisha; Ramaraju, Pradeep; Mohanasundaram, Sneka; Nguyen Vo, Dai-Viet (2022). Biosensor for heavy metals detection in wastewater: A review. *Food Chem Toxicol*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113307>.

Wadhwa, Tanu; Kakkar, Deepti; Wadhwa, Girish; Raj, Balwinder (2019). Recent Advances and Progress in Development of the Field Effect Transistor Biosensor: A Review. *J. Electron. Mater.* 48, 7635–7646. <https://doi.org/10.1007/s11664-019-07705-6>.

Wandermur, Gisele; Rodrigues, Domingos; Allil, Regina; Queiroz, Vanessa; Peixoto, Raquel; Werneck, Marcelo; Miguel, Marco. (2014). Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 661-666. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313008087>.

Wanjari, Vikram P.; Reddy, A.Sudharshan; Duttgupta, Siddhartha P.; Singh, Swatantra P. (2023). Laser-induced graphene-based electrochemical biosensors for environmental applications: a perspective. *Environ Science and Pollution Research* 30, 42643–42657. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21035-x>.

## ANEXO A



## Datasheet: 4329-4906

<b>Description:</b>	RABBIT ANTI ESCHERICHIA COLI
<b>Specificity:</b>	ESCHERICHIA COLI
<b>Format:</b>	Purified
<b>Product Type:</b>	Polyclonal Antibody
<b>Isotype:</b>	Polyclonal IgG
<b>Quantity:</b>	1 ml

## Product Details

**Applications**

This product has been reported to work in the following applications. This information is derived from testing within our laboratories, peer-reviewed publications or personal communications from the originators. Please refer to references indicated for further information. For general protocol recommendations, please visit [www.bio-rad-antibodies.com/protocols](http://www.bio-rad-antibodies.com/protocols).

	Yes	No	Not Determined	Suggested Dilution
Flow Cytometry			▪	
ELISA	▪			1/2000
Western Blotting			▪	

Where this product has not been tested for use in a particular technique this does not necessarily exclude its use in such procedures. Suggested working dilutions are given as a guide only. It is recommended that the user titrates the product for use in their own system using the appropriate negative/positive controls.

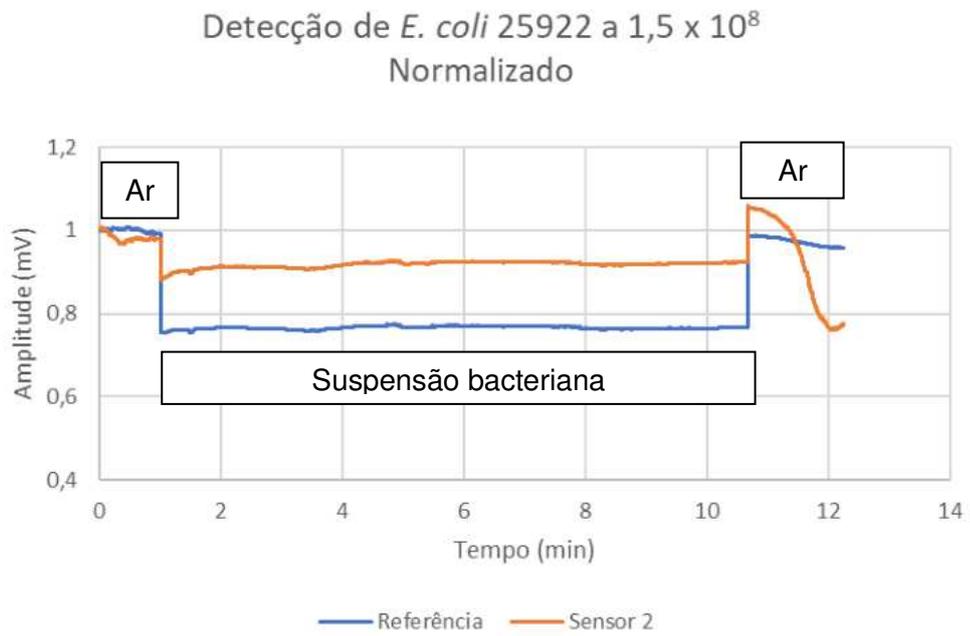
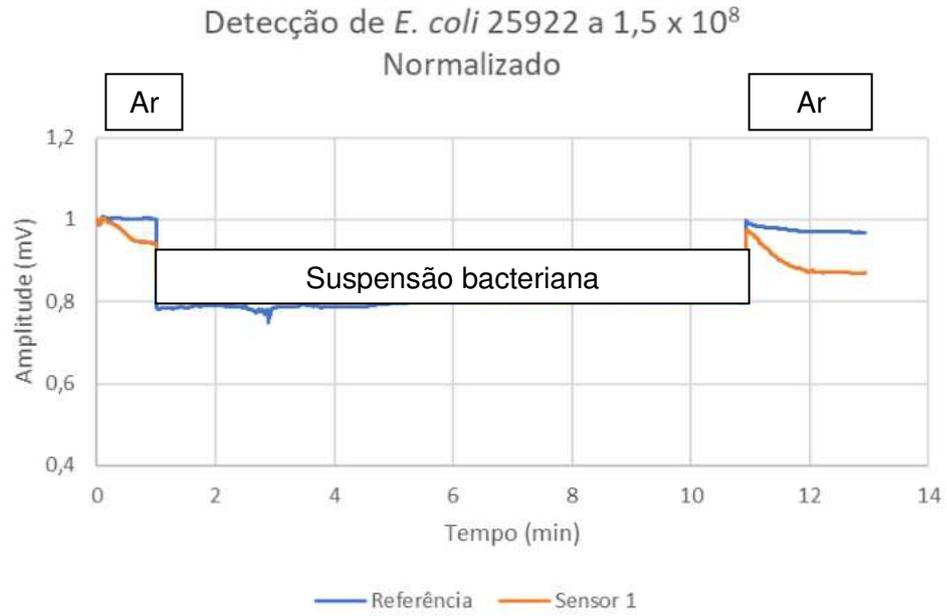
<b>Target Species</b>	Bacterial
<b>Product Form</b>	Purified IgG - liquid
<b>Buffer Solution</b>	Phosphate buffered saline
<b>Preservative</b>	0.1% Sodium Azide (NaN <sub>3</sub> )
<b>Stabilisers</b>	
<b>Approx. Protein Concentrations</b>	IgG concentration 4.0 mg/ml

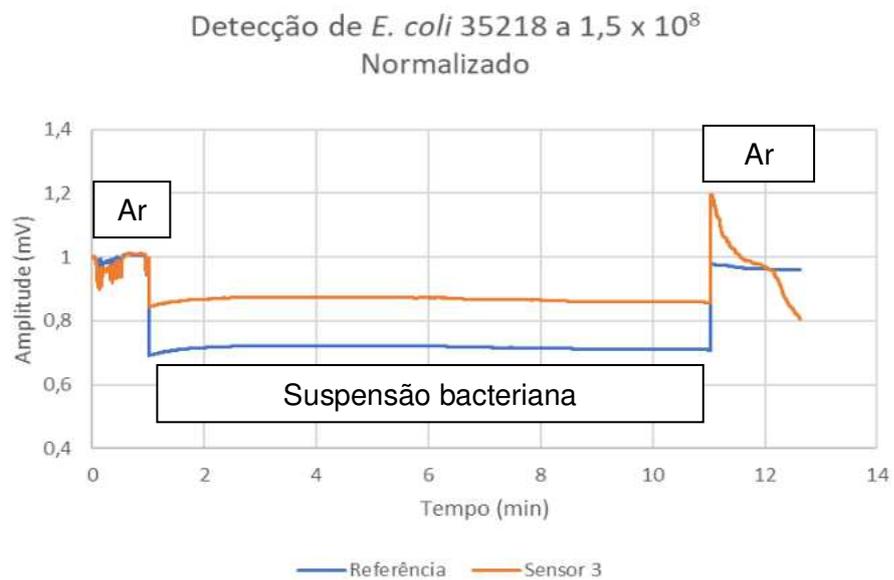
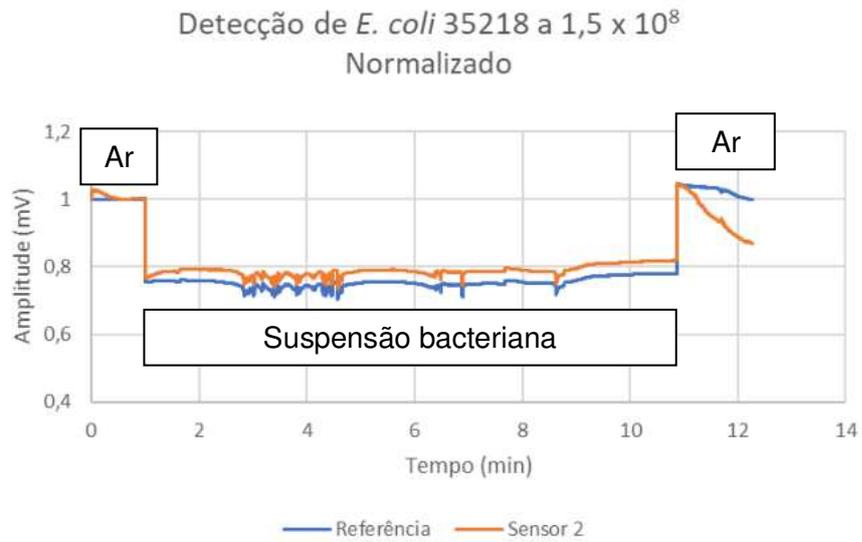
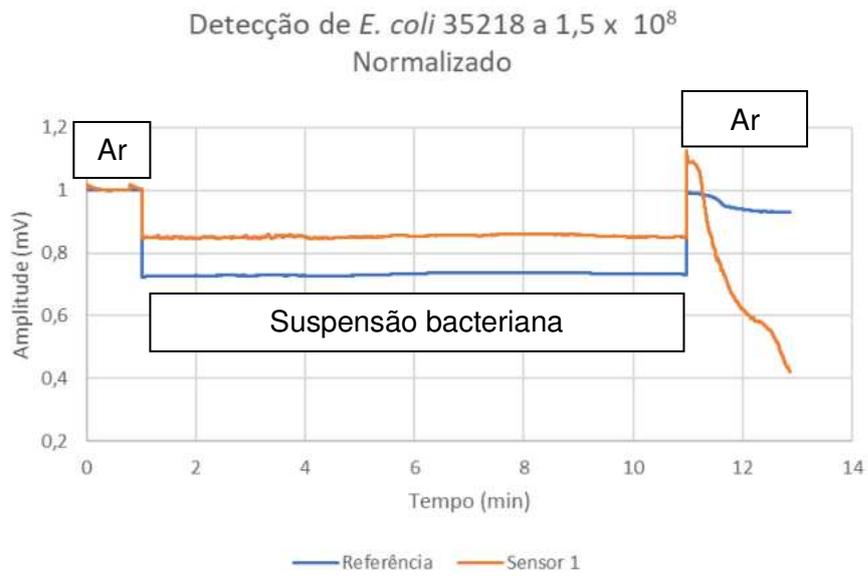
**Immunogen** A mixture of all antigenic serotypes.

**Specificity** **Rabbit anti *Escherichia coli* antibody** recognizes *Escherichia coli* and is broadly reactive with all somatic and capsular (O and K) antigenic serotypes. The somatic O antigens are composed of lipopolysaccharide complexes which form part of the cell wall structure of *E. coli* whilst the capsular K antigens are mainly composed of acidic polysaccharide.

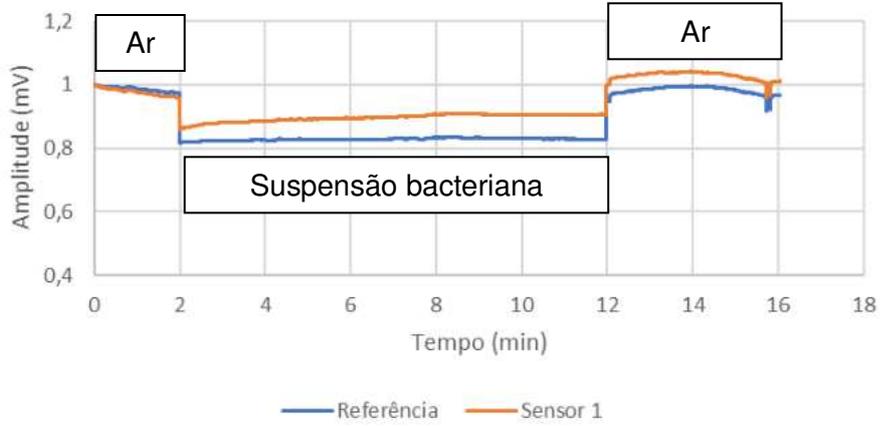
This antibody will remove *E.coli* proteins from recombinant preparations. Rabbit anti *Escherichia coli* antibody has not been absorbed and may cross-react with related enterobacteriaceae. Rabbit anti *Escherichia coli* antibody has been used in ELISA with serotypes O157:H7, O20, O125, O55, O111 and K12.

## ANEXO B

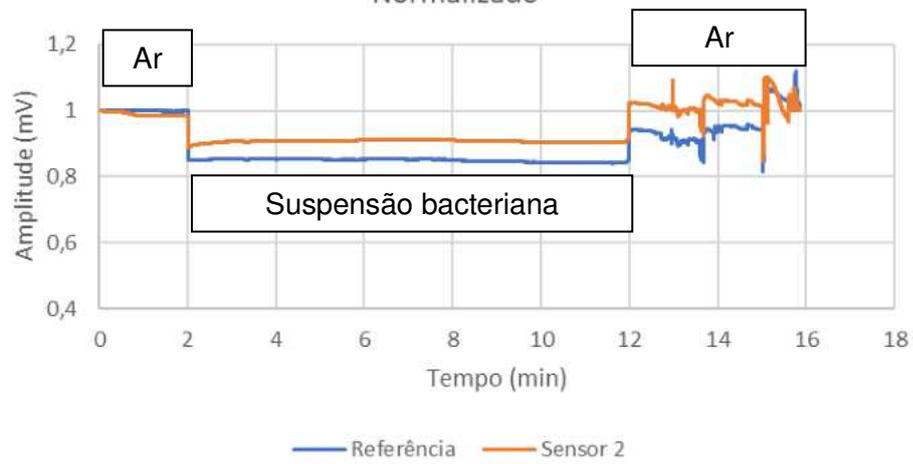




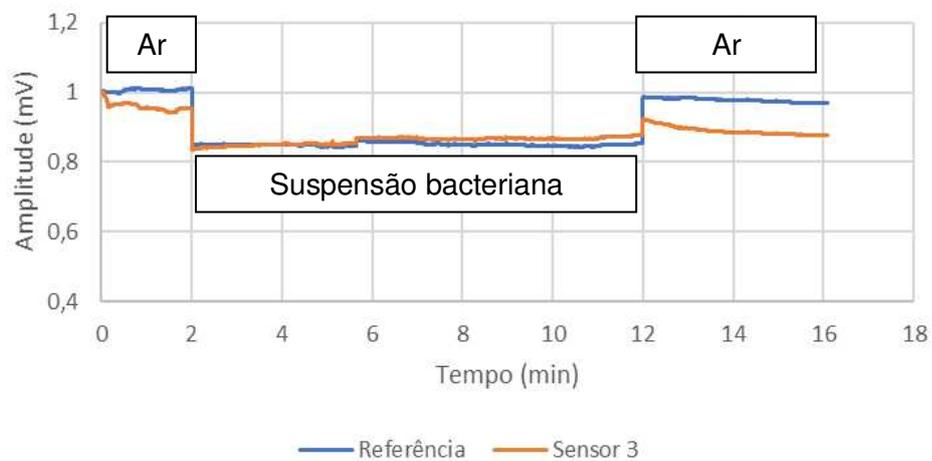
Detecção de *Klebsiella pneumoniae* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



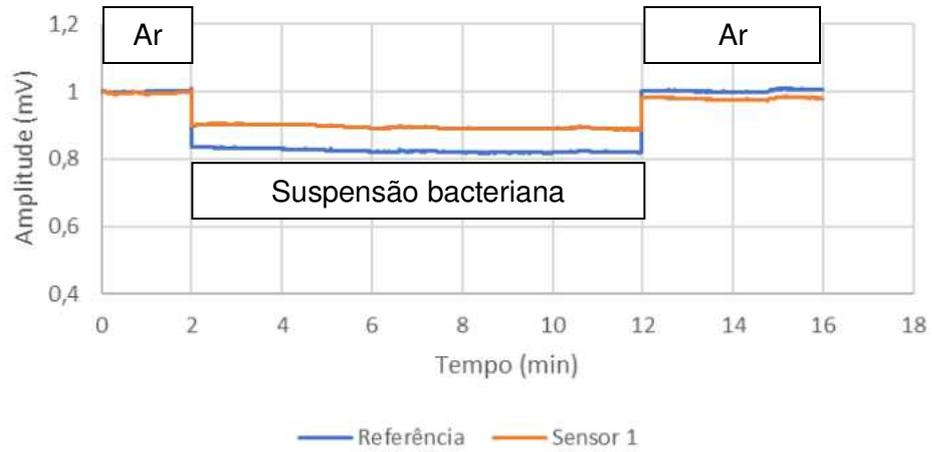
Detecção de *Klebsiella pneumoniae* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



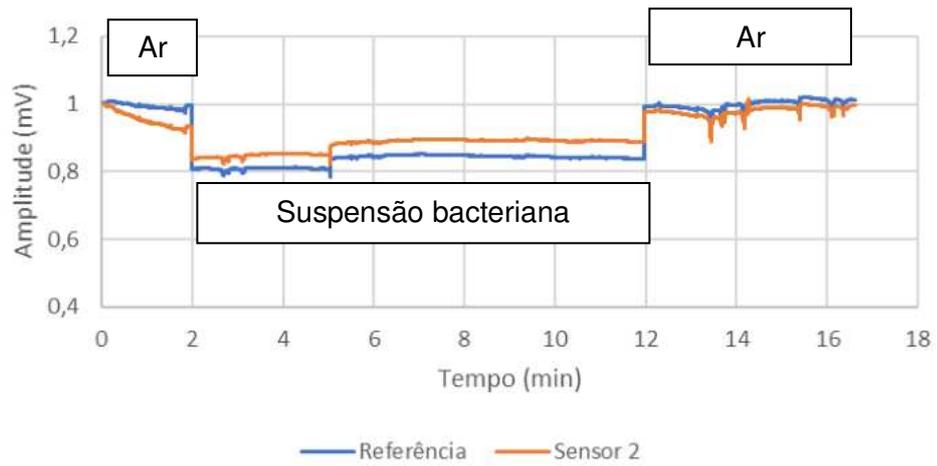
Detecção de *Klebsiella pneumoniae* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



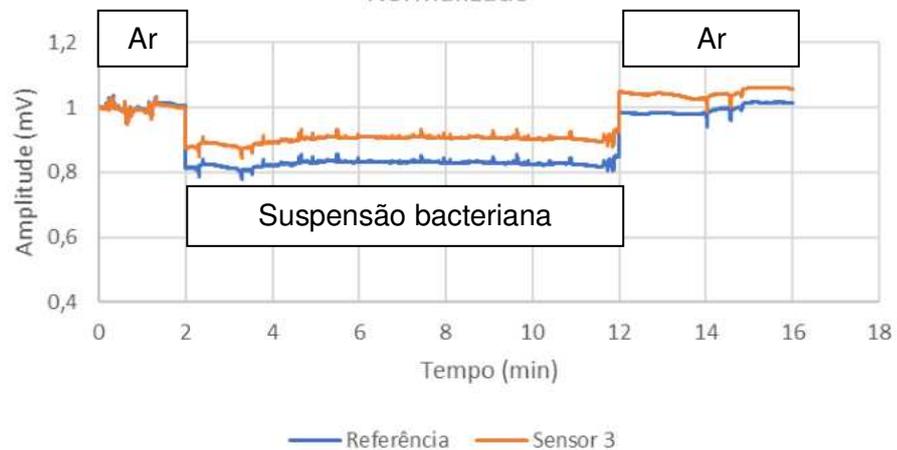
Detecção de *Pseudomonas aeruginosa* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



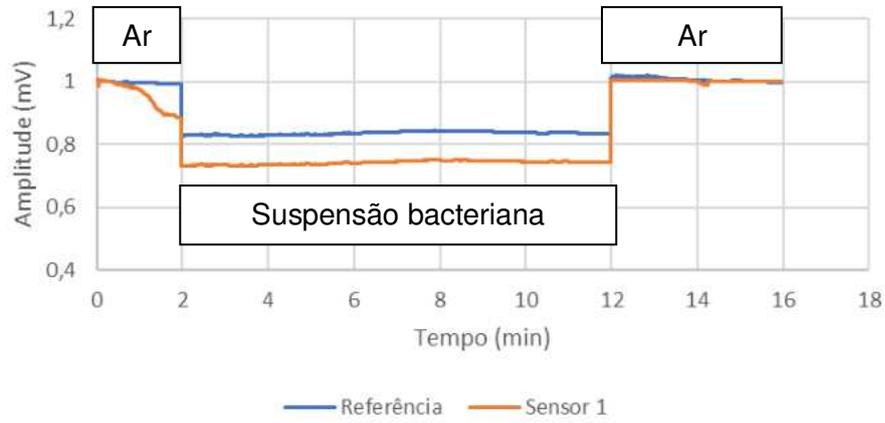
Detecção de *Pseudomonas aeruginosa* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



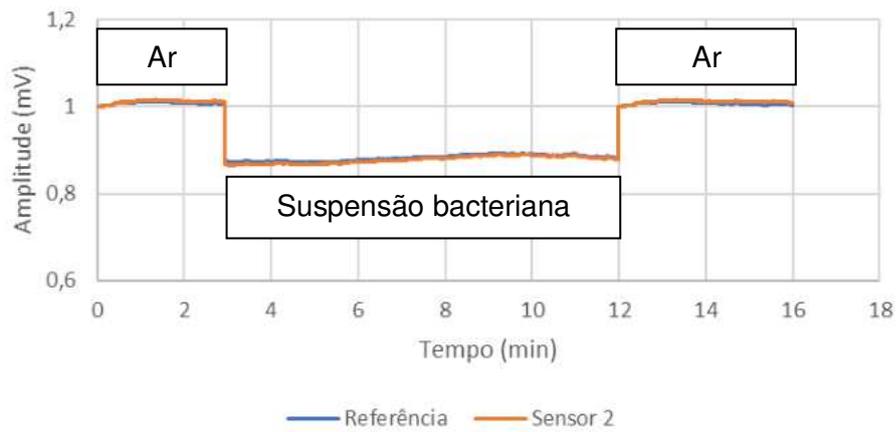
Detecção de *Pseudomonas aeruginosa* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



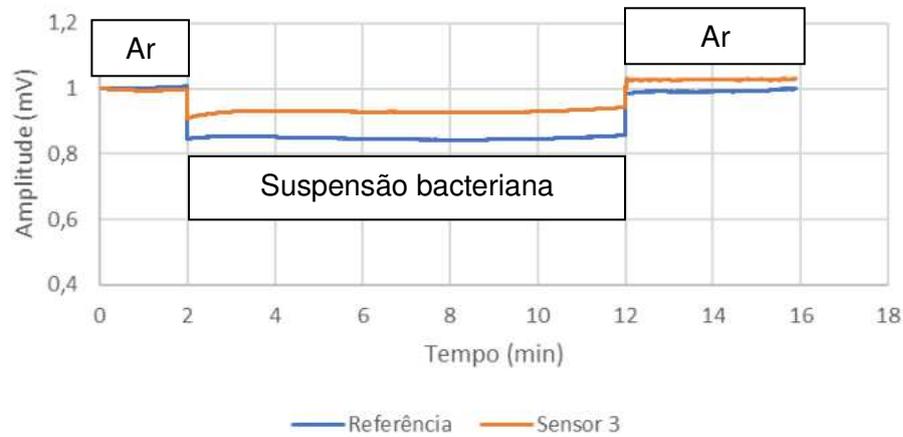
Detecção de *Staphylococcus aureus* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



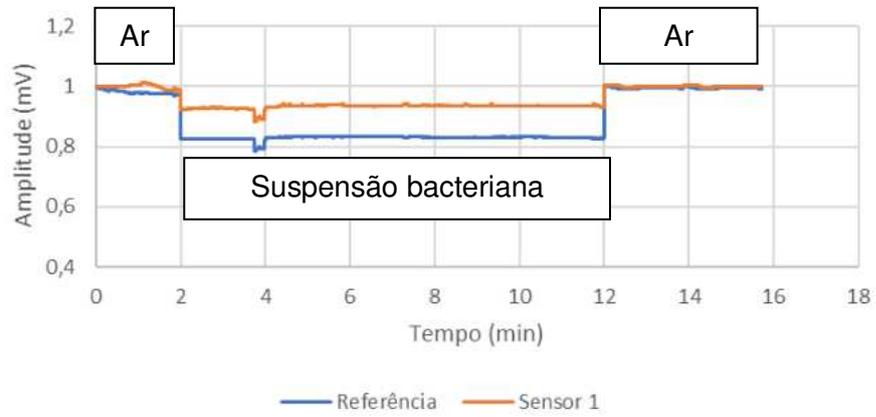
Detecção de *Staphylococcus aureus* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



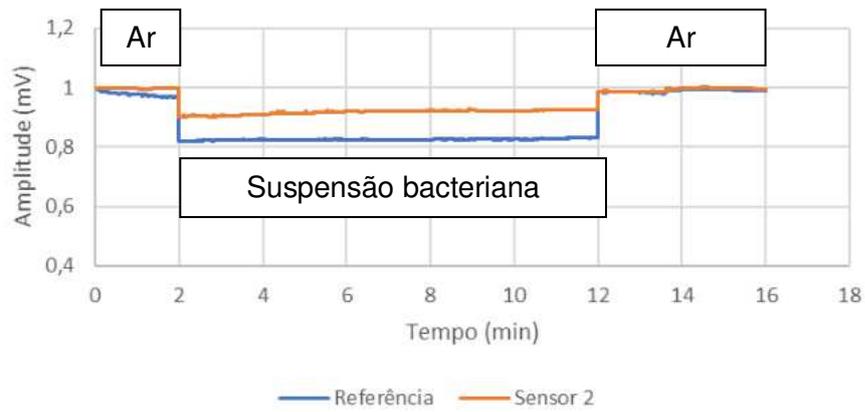
Detecção de *Staphylococcus aureus* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



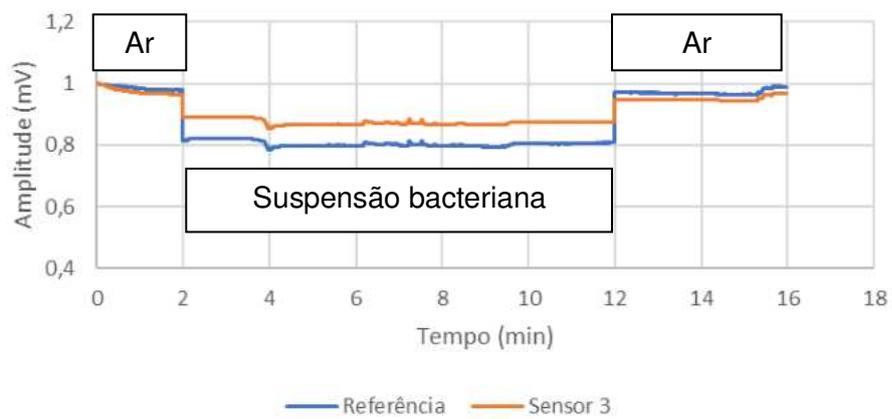
Detecção de *Bacillus cereus* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



Detecção de *Bacillus cereus* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



Detecção de *Bacillus cereus* a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL  
Normalizado



## ANEXO C

