



NANOBIOSENSOR A FIBRA ÓPTICA REVESTIDO COM FILME FINO DE
OURO PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI*

Ariadny da Silva Arcas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia da Nanotecnologia.

Orientador: Marcelo Martins Werneck

Rio de Janeiro

Maio de 2017

NANOBIOSENSOR A FIBRA ÓPTICA REVESTIDO COM FILME FINO DE
OURO PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI*

Ariadny da Silva Arcas

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DA NANOTECNOLOGIA.

Examinada por:

Prof. Marcelo Martins Werneck, Ph.D.

Dr. Alex Dante, D.Sc.

Prof. Marco Antônio Lemos Miguel, D.Sc.

Dra. Regina Célia da Silva Barros Allil, D.Sc.

Prof. Sérgio Álvaro de Souza Camargo Jr, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MAIO DE 2017

Arcas, Ariadny da Silva

Nanobiossensor a fibra óptica revestido com filme fino de ouro para detecção da bactéria *Escherichia coli*/ Ariadny da Silva Arcas. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

IX, 70 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Marcelo Martins Werneck

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia da Nanotecnologia, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 59-69.

1. Sensores a Fibra Óptica. 2. Detecção de Bactéria. 3. *E. coli*. 4. Nanobiossensor. I. Werneck, Marcelo Martins. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia da Nanotecnologia. III. Título.

Dedicatória

Dedico esta dissertação a toda minha família e amigos.

Dedico às minhas avós Ercília e Jhevenute e ao meu avô Generoso, in memoriam.

Aos meus pais Renaldo e Ilma pelo apoio e incentivo para sempre seguir em frente, enfrentando novos desafios, com fé em Deus.

Ao meu irmão Alysson pelo carinho e paciência comigo durante todos esses anos.

À minha tia Joana por todo apoio e incentivo necessário à minha permanência na cidade do Rio de Janeiro.

Agradecimentos

Agradeço a todos os meus professores, em especial ao meu orientador Prof. Marcelo Werneck pela orientação, apoio e confiança.

A toda equipe do Laboratório de Instrumentação e Fotônica pelo auxílio na produção deste trabalho, em especial à Prof.^a Regina, ao Domingos, à Rafaela, ao Fábio, à Vanessa, ao César e ao Bruno.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia (PENt) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo representado pelo Prof. Sérgio Camargo e ao secretário do Programa Rafael.

À Prof.^a Renata Gusmão, ao Prof. Marco Miguel, ao Prof. Dilson, e ao Prof. Ulisses pelo apoio técnico e científico.

Aos meus amigos do mestrado.

Aos meus amigos das famílias Jassniker, Goulart, Buzzeti, Magalhães, Gobbi, Santos, Gonçalves e Aquino.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

NANOBIOSSENSOR A FIBRA ÓPTICA REVESTIDO COM FILME FINO DE OURO PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI*

Ariadny da Silva Arcas

Maio/2017

Orientador: Marcelo Martins Werneck

Programa: Engenharia da Nanotecnologia

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma espécie de bactéria que habita normalmente o trato intestinal de seres humanos e de alguns animais, portanto, sua presença na água ou nos alimentos é um indicador de contaminação fecal. E a depender da espécie, sua ingestão pode ser prejudicial à saúde. O principal método para a detecção deste microrganismo consiste no uso do meio de cultura bacteriológica que consome tempo e necessita de laboratório com pessoal especializado. Outros métodos mais sofisticados, não são rápidos o suficiente porque requerem o envio de amostras ao laboratório e possuem custo elevado. Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um sensor a fibra óptica revestido com filme fino de ouro para a detecção da bactéria *E. coli* na água, como uma alternativa portátil, de resposta rápida e baixo custo às metodologias convencionais. O sensor é fabricado em fibra óptica plástica (POF) em forma de “U” e funciona pelo princípio de modulação de intensidade de luz monocromática por absorção imposta por dois efeitos: perda de luz na curva e Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). A seletividade à bactéria é conferida através da imobilização de anticorpos específicos na superfície da fibra. Foram testadas diversas espessuras do filme de ouro, que tem como objetivo melhorar a adesão da bactéria e permitir o efeito de SPR. O sensor apresentou um limite de detecção de bactérias de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL, demonstrando que esta tecnologia pode ser uma eficiente ferramenta para análise de rotina da potabilidade e balneabilidade da água e da qualidade dos alimentos.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

GOLD THIN FILM COATED FIBER-OPTIC NANOBIOSENSOR
FOR *Escherichia coli* BACTERIA DETECTION

Ariadny da Silva Arcas

May/2017

Advisor: Marcelo Martins Werneck

Department: Engineering Nanotechnology

Escherichia coli (*E. coli*) is a bacterial type that inhabits the intestinal tract of humans and animals, therefore, its presence in water and food is used as indicator of fecal contamination. Depending on the species, it can be harmful to health if ingested. The main method for this microorganism detection is the bacterial culture medium that is time-consuming and requires a laboratory with specialized personnel. Others sophisticated methods are still not fast enough because they require to send samples to the laboratory and have a high cost of analysis. This work presents the development of a fiber-optic sensor coated with gold thin film for *E. coli* detection in water as a portable, fast response and low-cost alternative to conventional methodologies. The sensor is manufactured in U-shaped plastic optical fiber (POF) and works by intensity modulation principle excited by a monochromatic light. The light absorption is imposed by two effects: bending loss by refraction and Surface Plasmon Resonance (SPR). Bacterial selectivity was obtained by specific antibodies immobilization on the fiber surface. Sensors coated with several thicknesses of gold thin film were tested in order to improve bacteria adhesion and to enable SPR effect. The sensor showed a detection limit of $1,5 \times 10^3$ CFU/mL of *E. coli* bacteria concentration, demonstrating that the technology might be an efficient tool for quality analysis of water and food.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	DEFINIÇÃO DO TEMA E MOTIVAÇÃO.....	1
1.2	OBJETIVOS.....	10
1.2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1	SENSORIAMENTO COM FIBRA ÓPTICA.....	11
2.1.1	ABSORÇÃO DO CAMPO EVANESCENTE.....	13
2.1.2	PERDA DE LUZ NA CURVA.....	14
2.2	RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR).....	15
2.3	RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR).....	18
2.4	INCERTEZA DE MEDIÇÃO E CALIBRAÇÃO.....	18
2.4.1	FUNDAMENTOS DO CÁLCULO DE INCERTEZA.....	18
2.4.2	CALIBRAÇÃO.....	20
2.5	REGRESSÃO INVERSA.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	INSTRUMENTAÇÃO OPTOELETRÔNICA.....	22
3.1.1	SETUP 1 – MICROCONTROLADOR ARDUÍNO.....	22
3.1.2	SETUP 2 – ESPECTRÔMETRO PORTÁTIL.....	23
3.2	FABRICAÇÃO DOS SENSORES.....	23
3.2.1	MOLDAGEM DAS FIBRAS EM FORMA DE “U”.....	24
3.2.2	DEPOSIÇÃO DO FILME DE OURO.....	24
3.2.3	CLIVAGEM E POLIMENTO.....	25
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO FILME DE OURO.....	25
3.3.1	MEDIDA DA ESPESSURA.....	26
3.3.2	MEDIDA DA TRANSMITÂNCIA.....	27
3.4	CALIBRAÇÃO DOS SENSORES EM SOLUÇÕES DE SACAROSE.....	28
3.4.1	TESTES COM O SETUP 1.....	29
3.4.2	TESTES COM O SETUP 2.....	29
3.5	IMOBILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS.....	30
3.5.1	PROTOCOLO I DE IMOBILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS AO SENSOR.....	32
3.5.2	PROTOCOLO II DE IMOBILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS AO SENSOR.....	33
3.6	PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS.....	35
3.7	TESTES DO NANOBIOSSENSOR NA DETECÇÃO DA BACTÉRIA.....	36
3.7.1	SETUP 1.....	36
3.7.2	SETUP 2.....	36

3.8	CARACTERIZAÇÃO DOS SENSORES COM BACTÉRIAS.....	36
3.8.1	ÁREA DE COBERTURA DA BACTÉRIA POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	36
3.8.2	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MEV	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO FILME FINO DE OURO.....	40
4.1.1	TRANSMITÂNCIA DO FILME	40
4.1.2	TAXA DE DEPOSIÇÃO E ESPESSURA DO FILME.....	41
4.2	RESULTADOS DOS TESTES DAS MEDIDAS DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO	42
4.2.1	ENSAIOS COM SACAROSE NO <i>SETUP</i> 1	42
4.2.2	ENSAIOS COM SACAROSE NO <i>SETUP</i> 2.....	44
4.3	RESULTADOS DOS TESTES COM BACTÉRIAS.....	47
4.3.1	ENSAIOS COM BACTÉRIAS NO <i>SETUP</i> 1	47
4.3.2	ENSAIOS COM BACTÉRIAS NO <i>SETUP</i> 2	49
4.4	TESTES DE SELETIVIDADE PARA A BACTÉRIA <i>E. COLI</i>	51
4.5	ÁREA DE COBERTURA POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	53
4.6	MICROGRAFIAS DA BACTÉRIA SOBRE O SENSOR	55
5	CONCLUSÕES	57
5.1	TRABALHOS FUTUROS.....	58
6	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Este capítulo trata do contexto geral da pesquisa e apresenta sua motivação e relevância no cenário mundial bem como os objetivos a serem atingidos.

1.1 DEFINIÇÃO DO TEMA E MOTIVAÇÃO

Anualmente são registrados milhares de casos de hospitalizações em decorrência das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), inclusive alguns resultando em mortes (LIN *et al.*, 2004). As DTAs têm aumentado de modo significativo em nível mundial (LU e JUN, 2012) e alguns dos fatores que contribuem para este aumento são: consumo de alimentos frescos sem a devida sanitização (HAVELAAR, 2010), crescimento populacional e urbanização desordenada, contaminação na indústria em decorrência de falhas na aplicação das boas práticas de fabricação e a necessidade de produção de alimentos em grande escala (MS, 2010; ALVES, 2012).

Dentre as bactérias causadoras das DTAs, as mais comuns são espécies do grupo da *Escherichia coli*. *E. coli* é uma espécie de bactéria Gram-negativa com cerca de 3 μm de comprimento e 1 μm de espessura em forma de bastonete, conforme mostrado na Figura 1.a. É constituída por uma membrana celular mais espessa formada por múltiplas camadas de peptidoglicano (açúcares e aminoácidos) responsáveis por conferir rigidez à célula (ESTRELA, 1997). Esta estrutura abriga o ácido desoxirribonucléico (DNA) que se encontra disperso no citoplasma, como visto na Figura 1.b.

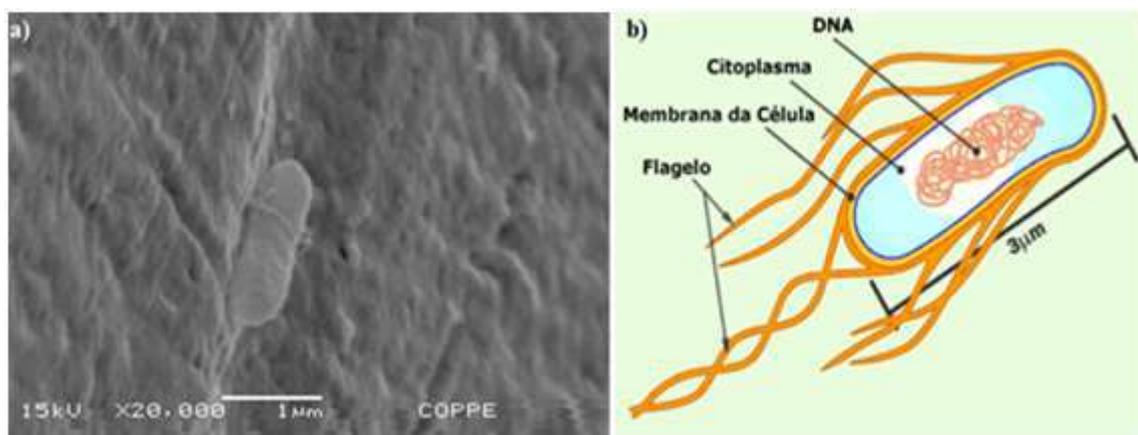


Figura 1 – a) Micrografia gerada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da bactéria *Escheria coli* sobre a superfície de um sensor a fibra óptica plástica; b) Representação da morfologia e estrutura celular da bactéria. Fonte: Adaptado de HOWSTUFFWORKS, 2001.

A *E. coli* pode estar presente em ambientes aquáticos, nas bebidas, nos alimentos tanto de origem vegetal quanto de animal e em seus derivados. Habita normalmente o trato intestinal de seres humanos e de alguns animais e por isso sua presença é uma indicação de contaminação fecal da água e dos alimentos (BOTTERO *et al.*, 2004; CELIKKOL-AYDIN *et al.*, 2014; RIJAL *et al.*, 2005; TORTORA *et al.*, 2012).

A maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas, todavia, algumas como a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 (expressa o antígeno 157 somático “O” e o antígeno 7 do flagelo “H”), encontrada naturalmente em reservatório do trato gastrointestinal de ruminantes, pode causar diarreia e, ocasionalmente, insuficiência renal (KRETZER *et al.*, 2008), podendo inclusive levar à morte (MEAD *et al.*, 1999; MITTELSTAEDT e CARVALHO, 2006; RANGEL, *et al.*, 2005; RIVEIRO *et al.*, 2004; RIVAS, 2012; CDC, 2016).

A contaminação por *E. coli* ocorre por via oral, geralmente pelo consumo de água contaminada, carne mal cozida, leite ou queijos não-pasteurizados, vegetais e legumes mal lavados, banho em rios, mares, lagos ou piscinas contaminadas e em contato direto com o ambiente ou fezes de animais (GORDON *et al.*, 2008; LOCKING *et al.*, 2001; SARTZ *et al.*, 2008; VRANJAC, 2011).

Sua importância como um problema de saúde pública pode ser constatada, por exemplo, em surtos como o ocorrido em julho de 1996 em algumas escolas da cidade de Sakai em Osaka no Japão onde mais de 7.000 pessoas entre crianças e adultos foram diagnosticados com infecções ocasionadas pela *E. coli* O157:H7 (WATANABE *et al.*, 1999; TORTORA *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2013). Em maio de 2000, na comunidade agrícola de Walkerton em Ontário no Canadá, um surto causou 7 mortes e infectou mais de 2.300 cidadãos (KRETZER *et al.*, 2008).

Surtos provenientes da contaminação por *E. coli* não são apenas um problema de saúde pública, são responsáveis também por prejuízos financeiros como o ocorrido na Alemanha em 2011, onde um surto causou US\$ 1,3 milhão de prejuízo aos agricultores e à indústria e exigiu mais US\$ 236 milhões para ajuda humanitária, pagos por 22 países da União Europeia (UE) (WHO, 2015).

No Brasil, entre 2000 e 2015, o Ministério da Saúde (MS) divulgou um relatório sobre DTAs com registro de 220.108 casos, sendo a maioria proveniente das espécies *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* sp (PORTAL DA SAÚDE, 2015).

Preocupados com a saúde e o bem estar dos cidadãos, órgãos sanitários do Brasil e do mundo adotaram como obrigatório a verificação periódica da presença de bactérias patogênicas nos alimentos, nas bebidas e nas águas destinadas à recreação visando indicar

a qualidade e a balneabilidade das mesmas evitando à exposição dos consumidores e dos banhistas a este microorganismo (GENG *et al.*, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através das Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 54, de 15 de junho de 2000 e da RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 obriga a verificação microbiológica laboratorial como forma de controle da qualidade da água e dos alimentos respectivamente para a segurança da saúde pública estabelecendo limites de aceitação quantitativa, (OIE, 2008; BARREIRO, 2015). A primeira resolução estabelece, por exemplo, que a água mineral não deve conter nenhuma bactéria *E. coli* em cinco amostras de 100 mL cada e, na segunda resolução, para a comercialização de alimentos *in natura* de origem vegetal, o limite máximo aceitável é de 10^2 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro), enquanto que o limite para os de origem animal resfriados, ou congelados, *in natura* é de 10^3 UFC/mL. Para alimentos sólidos prontos para o consumo (petiscos e similares), o limite aceitável não pode exceder a 10^2 UFC/g. E as águas doces, salobras e salinas destinadas à recreação não devem ter mais do que 8×10^2 bactérias para cada 100 mL de amostra (ANVISA, 2000; NSW Food Authority, 2009; CONAMA, 2017).

Atualmente, o método convencional mais utilizado para a detecção de agentes bacterianos é o de cultura bacteriológica, que funciona conforme ilustrado na Figura 2.

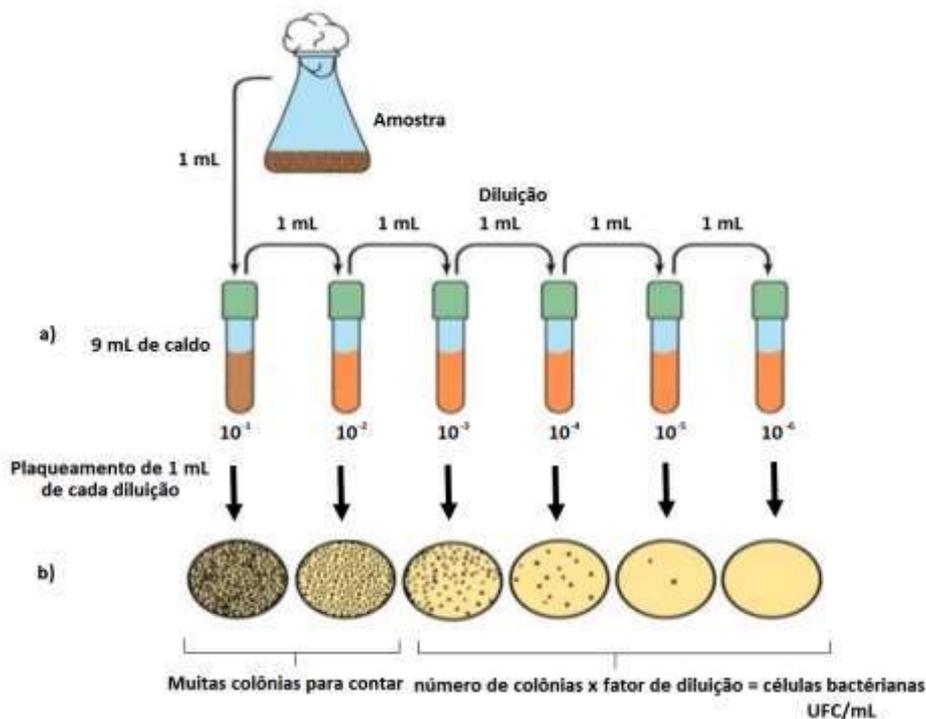


Figura 2 – Protocolo de contagem de cultura bacteriológica. a) caldo nutritivo para diluição; b) meio de cultura bacteriológico. Adaptado de: <<http://loretocollegebiology.Weebly.com/measuring-bacterial-growth.html>>. Acesso em 05 fev. 2017.

Este método depende de meios microbiológicos específicos (nutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismo, conforme mostrado na Figura 2.a) para isolar e enumerar as células bacterianas viáveis (conforme mostrado na Figura 2.b) presentes nas amostras e requer etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo, testes bioquímicos e testes sorológicos cujos resultados demoram 5 a 7 dias por dependerem da capacidade dos microrganismos de se multiplicarem (BERES *et al.*, 2011; GENG *et al.*, 2006; LAZCKA *et al.*, 2007; SILVA, 2002; ZOUROB *et al.*, 2008;).

Existem outros métodos de detecção mais rápidos, porém de maiores custos. São eles:

a) Espectrometria de massa – consiste no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas que quando em mistura produzem um espectro de massas específico para cada espécie (ASSIS *et al.*, 2011). Uma das formas de identificação consiste em um sistema no qual o material biológico é colocado em uma placa em que há a matriz polimérica (pontos pretos na Figura 3.a) que é bombardeada com a radiação de um laser provocando o processo de dessorção da matriz e da amostra, Figura 3.b. A amostra na fase gasosa e ionizada é acelerada por um campo elétrico em um tubo de vácuo onde são separadas em função da relação massa e carga, conforme mostrado na Figura 3.c. O material volatilizado dentro do tubo de vácuo (Figura 3.d) é então aspirado e levado a um detector como visto na Figura 3.e o qual registra a quantidade e o tempo que a amostra levou para percorrer a distância entre a placa e o detector. Este tempo é proporcional à massa molecular do material (PASTERNAK, 2012).

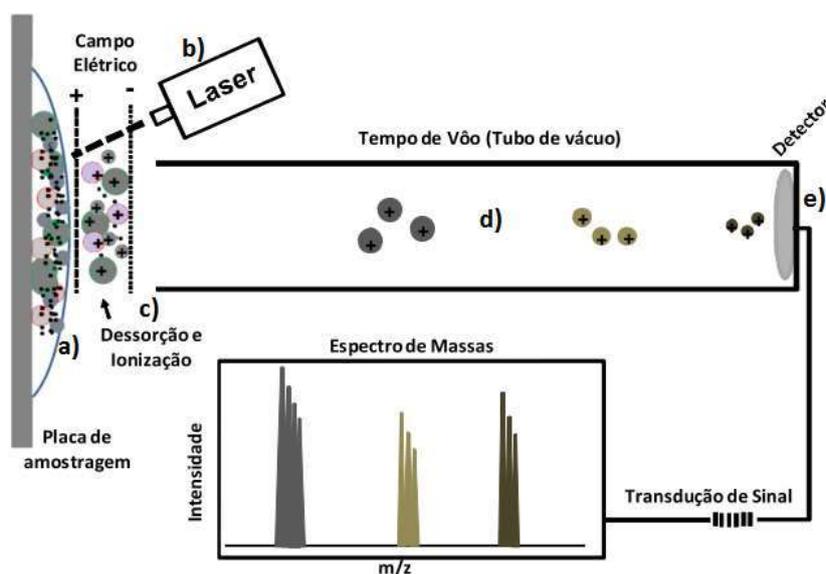


Figura 3 – Representação do funcionamento da espectrometria de massa. Fonte: Adaptado de ASSIS *et al.* (2011).

Essa mistura de moléculas vai resultar em um espectro de massa que é característico para cada espécie de microrganismo, independente da condição de cultivo e comparado com os espectros de um banco de dados, Figura 4.

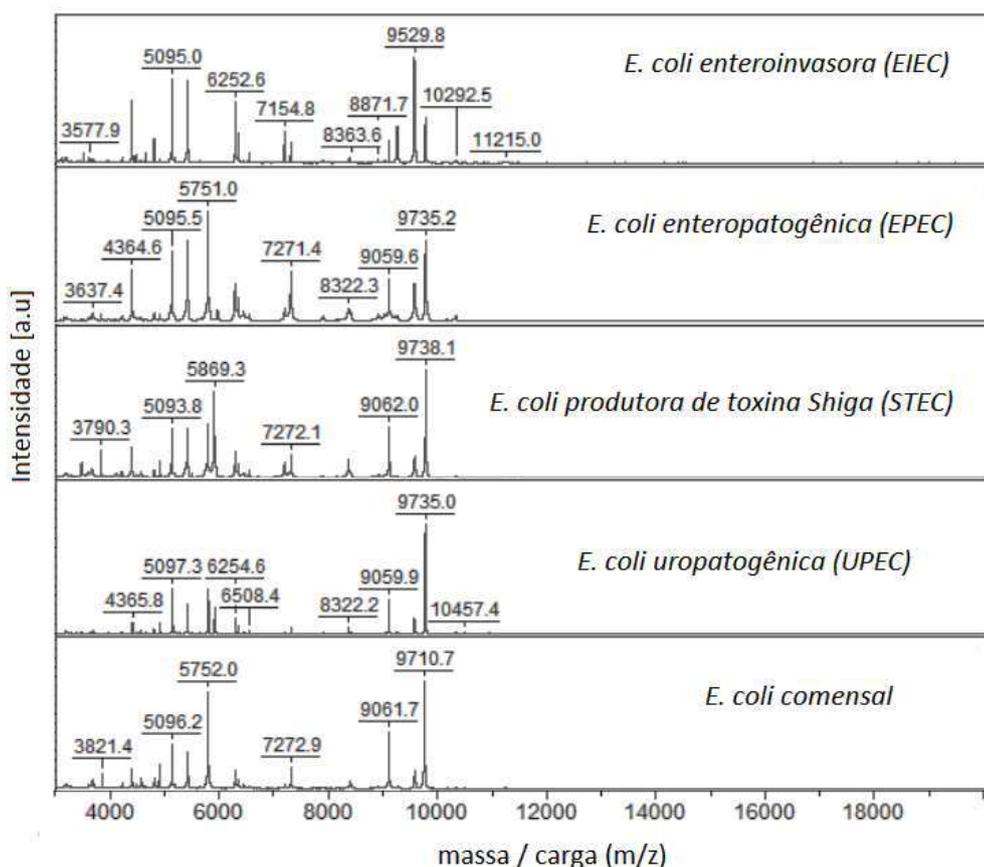


Figura 4 – Espectrometria de massa de algumas estirpes da bactéria *E. coli* medidas em massa/carga em função da intensidade em unidades arbitrárias [a.u.]. Fonte: Adaptado de DALLAGASSA (2012).

Os espectros da bactéria *E. coli* apresentados na Figura 4 demonstram que para cada estirpe da bactéria existe um espectro específico correspondente com intensidades diferentes. A vantagem do uso desta técnica é o curto tempo de resposta, contudo, possui certa dificuldade em analisar microrganismos com parede celular muito espessa (ASSIS *et al.*, 2011) e necessita de um banco de dados de custo elevado. BARREIRO (2015) utilizou esta técnica para bactérias *E. coli* em amostras de leite e encontrou um limite de detecção de 10^7 UFC/mL, um valor elevado que, segundo a autora, se deve à grande quantidade de proteínas presentes na amostra que resulta em sobreposição do espectro para moléculas de peso molecular semelhante.

b) Ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) – é uma técnica bioquímica utilizada para detectar a presença de um anticorpo ou de um antígeno em uma amostra. Este teste de forma geral funciona por meio de uma

placa de poliestireno imobilizada com anticorpo específico onde é adicionada a amostra. Se a bactéria estiver presente, ocorrerá a formação de um complexo anticorpo-antígeno. Em seguida, são adicionados anticorpos específicos conjugados com uma enzima, geralmente a peroxidase. Esses anticorpos conjugados reagem com o complexo anticorpo-antígeno e após a adição do substrato da enzima resultará na produção de uma coloração que poderá ser observada por microscopia ou detectada por espectrofotometria (ROEHE, 1999), Figura 5.



Figura 5 – Representação do mecanismo de detecção por ELISA. Fonte: Adaptado de RICA e STEVENS (2012).

Esta técnica pode ser empregada na detecção da presença de antígenos de moléculas de vírus, células, enzimas, proteínas, anticorpos, hormônios, bactéria e toxinas que são reconhecidos por um anticorpo ou pode ser utilizada para testar anticorpos que reconhecem um antígeno específico. Para correto funcionamento, depende essencialmente da utilização de reagentes específicos, concentrações adequadas, tempo de incubação (quando necessário) e sucessivas lavagens (SB, 2004). É uma técnica extremamente seletiva e possibilita combinações com outros métodos de modo a melhorar sua sensibilidade. Como exemplo, o ELISA apresenta baixa sensibilidade para a *E. coli* O157:H7 (um limite de detecção de 2×10^4 UFC/mL) (SHAN *et al.*, 2016) e por este motivo, muitas vezes é combinado com o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

c) Reação em cadeia polimerase (PCR) – é um método de análise empregado na detecção de moléculas (vírus, bactérias, doenças genéticas) por meio de uma reação de amplificação de um fragmento de DNA ou do ácido desoxirribonucléico (RNA) proveniente de amostras de tecidos, sangue, pele, cabelo, saliva ou bactérias (GARIBYAN e AVASHI, 2013; SERAFINI *et al.*, 2002; MOTOKANE e VALLE, 2005). Na detecção por PCR uma amostra contendo uma quantidade mínima de DNA ou

RNA é amplificada, ou seja, ocorre a reprodução de várias sequências do mesmo fragmento por meio de uma reação química em tubo de ensaio (HUMPREY, 2000) ilustrado na Figura 6.

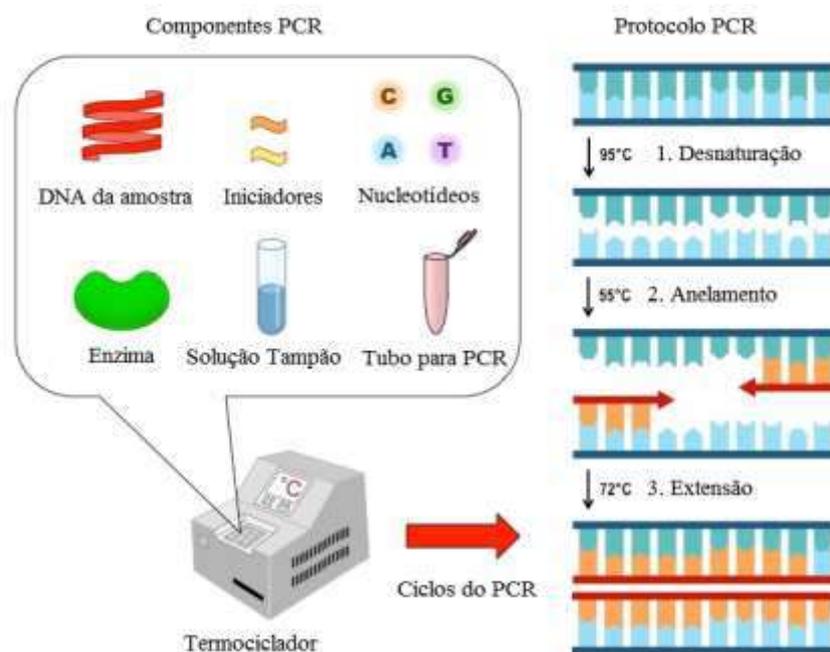


Figura 6 – Mecanismo de teste por PCR. Fonte: Adaptado de <http://ib.bioninja.com.au/_Media/pcr-components_med.jpeg>. Acesso em: 10 fev. 2017.

A Figura 6 apresenta o mecanismo de teste por PCR onde a amostra é misturada aos nucleotídeos, aos iniciadores, à enzima e à solução tampão onde em seguida é termociclada passando por sucessivos ciclos de temperaturas. Inicialmente, a temperatura atinge 95 °C para que ocorra a separação da dupla hélice do DNA, ou seja, a sua desnaturação. Em seguida, a temperatura é reduzida até 55 °C para que os iniciadores se empalhem com a fita molde de DNA ocorrendo o anelamento. Por último, a temperatura é novamente elevada até 72 °C para que a enzima possa sintetizar e formar uma nova fita dupla (MACÊDO *et al.*, 2007; DICKEL *et al.*, 2005).

O resultado é analisado através de uma eletroforese em gel e depois interpretado. A resposta pode sair em 24 horas a depender do tipo de amostra em estudo (LAZCKA *et al.*, 2007; FUKUSHIMA *et al.*, 2010; FUNG, 2000). Este método tem capacidade de detecção de 10^2 bactérias para *E. coli enteroagregativa* (EAEC), *enteropatogênica* (EPEC) e *enterotoxigênica* (ETEC) (SJOLING *et al.*, 2015). Requer o uso de profissionais habilitados e que o DNA seja corretamente amplificado além de empregar reagentes de alta qualidade, o que torna o procedimento altamente custoso (AMANI *et al.*, 2015). Assim como o teste ELISA, o PCR apresenta um protocolo de execução

complicado, o que favorece a adoção da cultura bacteriológica pela grande maioria dos laboratórios (ASSIS *et al.*, 2011).

As técnicas descritas anteriormente, apesar de confiáveis e de apresentarem resultados relativamente rápidos, não são portáteis, requerem o envio das amostras para laboratório, e possuem custo elevado por utilizar equipamentos e protocolos complexos de tecnologia mais avançada e necessitar de operadores especializados (ZOUROB *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2011). Por este motivo tem-se buscado novas alternativas de tecnologias como a dos biossensores que surgem com a proposta de produzir resultados confiáveis em menor tempo e com redução de custos, (LAZCKA *et al.*, 2007).

Com objetivo de desenvolver uma solução portátil, com resposta rápida e de baixo custo para detecção de microrganismos, nas duas últimas décadas surgiram os sensores biológicos das mais variadas tecnologias. Esses dispositivos são capazes de converter efeitos físicos, químicos ou biológicos em sinais processáveis (NEVES, 2011).

Dentre as tecnologias empregadas como sensores, as que utilizam a fibra óptica como transdutores tem se mostrado promissoras por serem leves, permitirem o uso de instrumentação de baixo custo, e de simples implementação.

Atualmente, existem inúmeros estudos e desenvolvimentos de biossensores com os mais variados princípios de detecção baseados em fibras ópticas. GENG *et al.* (2006), por exemplo, desenvolveram um biossensor a fibra óptica por absorção do campo evanescente para detecção da *E. coli* O157:H7 em carne moída. O sensor foi capaz de medir concentrações de 10^4 UFC/mL da bactéria após 4 horas. WANDERMUR (2013) desenvolveu um biossensor a fibra óptica plástica (POF) para detecção da bactéria *E. coli* O55 pelo princípio do campo evanescente e apresentou um limite de detecção de 10^4 UFC/mL.

Com o advento da nanotecnologia, surgiu uma nova categoria de biossensores, chamados de nanobiossensores, que se aproveitam das propriedades únicas dos nanomateriais para produzir sensores mais rápidos e mais sensíveis (RA *et al.*, 2012).

BACCAR *et al.* (2010), por exemplo, desenvolveram um nanobiossensor simples e de baixo custo por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) em um filme fino de ouro sobre um prisma para detecção da *E. coli*. O nanossensor apresentou um limite de detecção de 10^3 UFC/mL. TAYLOR *et al.* (2006) desenvolveram um sensor por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) também com filme fino de ouro sobre um prisma para detecção simultânea de quatro espécies de bactérias: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni*. Os limites de

detecção para cada tipo de bactéria foram, respectivamente, $1,4 \times 10^4$ UFC/mL, $4,4 \times 10^4$ UFC/mL, $3,5 \times 10^3$ UFC/mL e $1,1 \times 10^5$ UFC/mL. CAMARA *et al.* (2013) produziram um nanobiossensor a fibra óptica para detecção do vírus da dengue pelo princípio de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) usando nanopartículas de ouro, onde obteve um limite de detecção de 0,074 µg/mL de antígenos.

No que se refere à detecção da bactéria *E. coli*, outros trabalhos foram encontrados e estão listados de forma resumida na Tabela 1.

Tabela 1 – Referências de biossensores e nanobiossensores para detecção da bactéria *Escherichia coli*.

	Técnica	Estirpe da <i>E. coli</i>	Limite de detecção (UFC/mL)	Referência
Biossensores	Campo evanescente em fibra óptica	O157:H7	10^3	GENG <i>et al.</i> (2006)
		O55	10^4	WANDERMUR <i>et al.</i> (2014)
	Eletroquímico por condutividade	O157:H7	$7,9 \times 10^1$	MUHAMMAD-TAHIR e ALOCILJA (2003)
	Espectroscopia de impedância eletroquímica		10^3	LI <i>et al.</i> (2014)
	Microscopia de Fluorescência	ATCC 35218	10^3	YOO <i>et al.</i> (2014)
Nano-biossensores	SPR em prisma	O157:H7	10^2 - 10^3	WASWA <i>et al.</i> (2007)
		K12	10^3	BACCAR <i>et al.</i> (2010)
	LSPR	B40	10^8	HALKARE <i>et al.</i> (2015)

Uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF) da COPPE/UFRJ é justamente o desenvolvimento de um sensor a fibra óptica plástica em forma de “U” para detecção da bactéria *E. coli*. Dentro dessa linha de pesquisa, WANDERMUR (2013) desenvolveu um biossensor a fibra óptica plástica em “U” pelo efeito do campo evanescente usando a técnica da imunocaptura (antígeno/anticorpo). O biossensor foi capaz de detectar 10^4 UFC/mL da bactéria *E. coli*.

Ainda na mesma linha de pesquisa, WANDERMUR *et al.* (2013) testou a eficiência do sensor POF em “U” com e sem casca, sem revestimento de ouro, na medição do índice de refração e demonstrou que a retirada da casca proporcionou um aumento de 5 % na sensibilidade, ou seja, o benefício é muito baixo diante da dificuldade do processo de remoção da casca, que ainda deixa resíduos indesejáveis.

Com o objetivo de aprimorar a técnica de sensoriamento por fibra óptica plástica em U, dando continuidade à linha de pesquisa desenvolvida pelo LIF, esse trabalho propõe o

desenvolvimento de um nanobiossensor a fibra óptica revestido com filme fino de ouro para a detecção da bactéria *E. coli* por modulação da intensidade de luz através de duas técnicas: perda de luz na curva e SPR, como uma alternativa portátil, de baixo custo e resposta mais rápida que os métodos convencionais. A fibra óptica plástica foi escolhida por seu baixo custo e pela facilidade de manuseio. Optou-se pelo sensor em forma de “U” para permitir o efeito da perda de luz na curva e SPR sem a necessidade de remoção da casca. A modulação de intensidade da luz foi escolhida por ser a técnica de instrumentação de menor custo de implementação.

A camada de ouro tem como objetivo melhorar a técnica de imobilização dos anticorpos sobre a superfície sensora da fibra óptica, uma vez que os protocolos são bem conhecidos e difundidos e têm sido aplicados com sucesso, além de ser um metal com elevada estabilidade química e alta resistência à corrosão (BACCAR *et al.*, 2010; CAMARA, 2015; CAO *et al.*, 2014; HOMOLA *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2007; PARK *et al.*, 2015; ROUSHANI *et al.*, 2016; SAHA *et al.*, 2012; SERRA, 2010; STEEL *et al.*, 1998).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um nanobiossensor a fibra óptica revestido com filme fino de ouro para a detecção da bactéria *E. coli* como alternativa portátil, de resposta rápida e baixo custo aos métodos convencionais.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Depositar e caracterizar os filmes finos de ouro;
- Investigar os efeitos do filme de ouro sobre o sensor na medição do índice de refração;
- Determinar a sensibilidade e incerteza de medição do sensor com ouro na medida de índice de refração dentro da faixa de aplicação;
- Testar a eficiência dos protocolos de imobilização de anticorpos na imunocaptura das bactérias bem como a sua seletividade;
- Determinar o desempenho e o limite de detecção dos sensores medindo bactérias em soluções salinas de 0,85 %;

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo descreve, de forma sucinta, os principais conceitos teóricos necessários para a compreensão das técnicas aplicadas neste trabalho.

2.1 SENSORIAMENTO COM FIBRA ÓPTICA

A fibra óptica plástica ou POF (do inglês *Plastic Optical Fiber*) é um filamento flexível, transparente, leve, facilmente moldável, e utilizado como condutor de elevado rendimento de luz (KIM *et al.*, 2009; WANDERMUR, *et al.*, 2014). É fabricada com núcleo de polimetilmetacrilato (PMMA) envolvido por uma casca (*cladding*) de polímero fluoretado ou outro material dependendo do tipo de aplicação. Quando comparada à fibra de sílica, possui custo mais baixo, tanto a fibra quanto os componentes eletrônicos do sensor (FERNANDES, 2009).

As fibras podem ser do tipo monomodo, onde há um único modo de propagação, ou multimodo que transmitem a luz em diversos modos de propagação, ou seja, com vários ângulos de reflexão. A Figura 7 apresenta o mecanismo de propagação da luz nas fibras monomodo e multimodo.

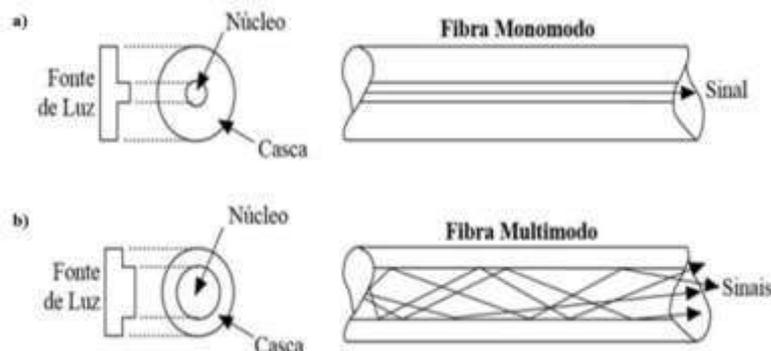


Figura 7 – Ilustração do mecanismo de propagação da luz nas fibras pelo conceito de óptica geométrica. a) monomodo e b) multimodo. Fonte: Adaptado de PINTO *et al.* (2014).

As fibras do tipo monomodo, Figura 7.a, apresentam como vantagem a transmissão de informações a longas distâncias quando comparadas as fibras ópticas multimodo apresentando taxas de transmissão superiores a 160 Gb/s e uma atenuação de 0,2 dB/km para os comprimentos de onda de 850 nm, 1300 nm e 1550 nm. No entanto, possuem núcleo de dimensão reduzida o que dificulta o alinhamento da fonte de luz, do receptor e conexões, além de apresentar custo maior, tanto da fibra quanto dos componentes utilizados em sua interface optoeletrônica (FERNANDES, 2009).

As fibras do tipo multimodo possuem grande abertura numérica, o que permite o uso de LEDs (do inglês *Light Emitting Diode*) como fonte de luz de baixo custo. Porém, apresentam como desvantagem a transmissão de informações a curtas distâncias com taxas de transmissão menores que 10 Gb/s e uma atenuação entre 140 a 180 dB/km para os comprimentos de onda de 650 nm (KAMINO, 2000). Isto ocorre por causa da dispersão modal onde os modos se propagam por distâncias diferentes, como visto na Figura 7.b. No entanto, para aplicações em sensoriamento cuja transmissão geralmente é feita em distâncias menores que 20 cm, essa atenuação é irrelevante.

Uma fibra óptica multimodo é projetada de tal forma que os diferentes modos de propagação incidam na interface núcleo-casca com ângulo maior que o ângulo crítico e se propagem dentro do núcleo por reflexão interna total (TIR, do inglês *Total Internal Reflection*), sem perda de energia para o meio externo, Figura 8. Para isso, é necessário que o índice de refração do núcleo seja maior que o da casca.

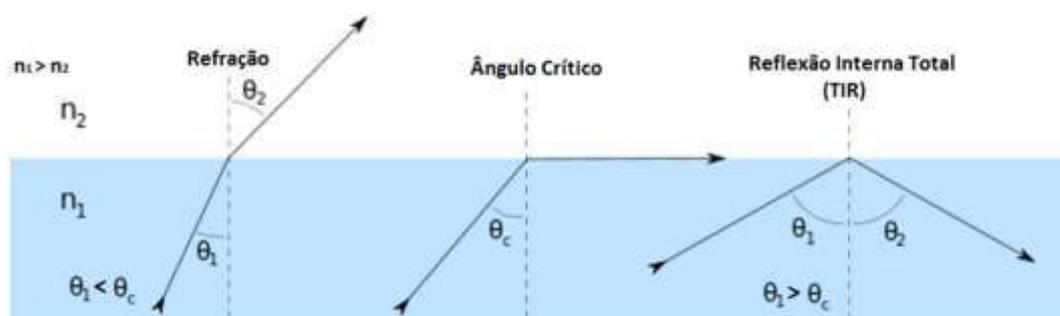


Figura 8 – Reflexão de feixes de luz em uma interface de dois meios dielétricos em diferentes ângulos.

A Figura 9 mostra a propagação da luz dentro de um cilindro de acrílico como ocorre em uma fibra óptica.

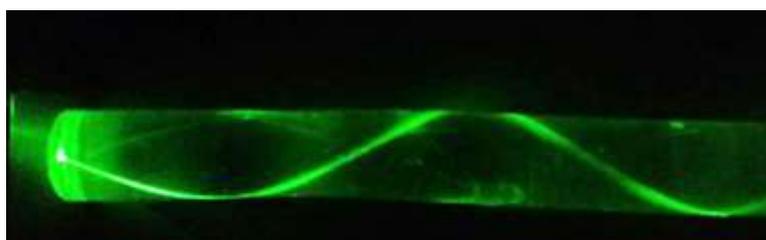


Figura 9 – Experimento realizado no laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF) com um cilindro de acrílico para demonstrar a propagação da luz por reflexão interna total da mesma forma que acontece dentro de uma fibra óptica multimodo. Na foto é possível visualizar mais de um modo de propagação.

O ângulo de incidência crítica Θ_c a partir do qual a reflexão total ocorre é obtido pela Equação 1, segundo a Lei de Snell, onde n_2 é o índice de refração da casca e n_1 o índice de refração do núcleo, e $n_1 > n_2$.

$$\theta_c = \text{sen}^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (1)$$

As fibras ópticas podem ser utilizadas como sensores de diversas grandezas físicas, inclusive do índice de refração. As principais técnicas utilizadas são descritas nos itens a seguir.

2.1.1 ABSORÇÃO DO CAMPO EVANESCENTE

A luz se propaga no interior da fibra óptica pelo princípio da reflexão interna total. Na interface núcleo-casca onde ocorre a TIR é gerado um campo eletromagnético que se estende para o meio de menor índice de refração com alcance de aproximadamente metade do comprimento de onda da luz incidente, Figura 10.

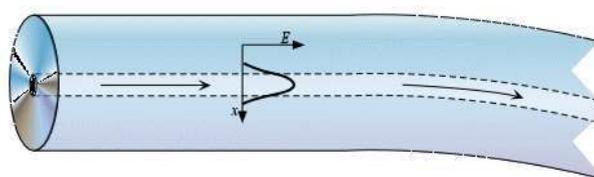


Figura 10 – Campo evanescente gerado pela TIR na interface núcleo-casca se propaga para o interior da casca com um alcance de aproximadamente $\frac{\lambda}{2}$, onde λ é o comprimento de onda da luz incidente. Fonte: <<http://physics.stackexchange.com/questions/106477/graded-index-fiber>>. Acesso em: 09 de mar. 2017.

Como as fibras ópticas são desenvolvidas para telecomunicações, elas são fabricadas com uma casca de espessura suficiente para confinar o campo evanescente em seu interior evitando a perda de luz na transmissão por absorção pelo meio externo. Contudo, se o campo evanescente for exposto ao meio, a fibra óptica pode ser utilizada como um elemento sensor. Esta técnica é muito utilizada em sensoriamento à fibra óptica.

Existem várias maneiras de expor o campo evanescente da fibra, sendo a principal através da remoção da casca, mas também pode ser obtida através do afinamento e do polimento da fibra, conforme exemplos vistos na Figura 11.

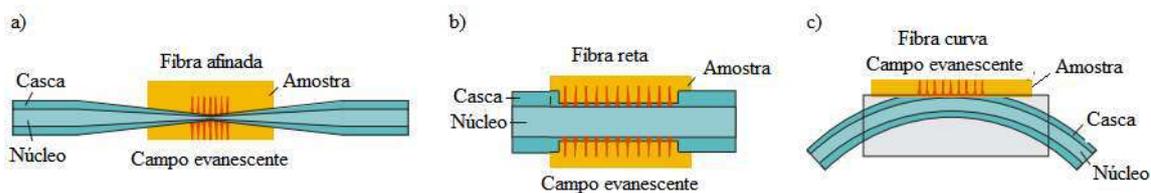


Figura 11 – Exemplos de técnica para exposição do campo evanescente de uma fibra óptica para uso como sensor: a) afinamento; b) remoção da casca; c) curvatura com polimento. Fonte: adaptado de WAECHTER *et al.* (2010).

O campo evanescente, uma vez exposto, ao entrar em contato com o analito será absorvido em função da densidade óptica do meio. A densidade óptica relaciona a absorção de luz com as propriedades do material atravessado por ela, segundo a

Equação 2 (MANTELE e DENIZ, 2017), onde I é a intensidade da luz transmitida e I_0 é a intensidade da luz incidente.

$$\text{Densidade Óptica} = -\log \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

A depender das características e da concentração do analito, a luz que se propaga na fibra vai ser mais ou menos atenuada devido a absorção do campo evanescente pelo meio externo (FABIAN *et al.*, 2008; KHIJWANIA e GUPTA, 1999; WERNECK *et al.*, 2017). Este princípio apresenta como desvantagem a necessidade de expor o núcleo da fibra, tarefa que não é simples e pode danificar sua estrutura.

2.1.2 PERDA DE LUZ NA CURVA

A curva em uma fibra óptica faz com que os modos de propagação de ordem superior (feixes de luz que refletem com ângulos próximos ao ângulo crítico) incidam com ângulo menor que o crítico e escapem para o meio externo. A esse fenômeno, dá-se o nome de perda de luz na curva. Os modos de propagação de ordem inferior são mantidos confinado no núcleo, e mesmo na curva se propagam por reflexão interna total, logo, vai existir perda de luz também por absorção do campo evanescente pelo meio externo. Percebe-se que nesta configuração vão existir os dois fenômenos, porém, a perda de luz na curva é o de maior predominância, podendo o seu efeito ser até 100 mil vezes maior que o de absorção do campo (SATIJA *et al.*, 2014).

O funcionamento do sensor em “U” pelo princípio de perda de luz na curva está ilustrado na Figura 12.

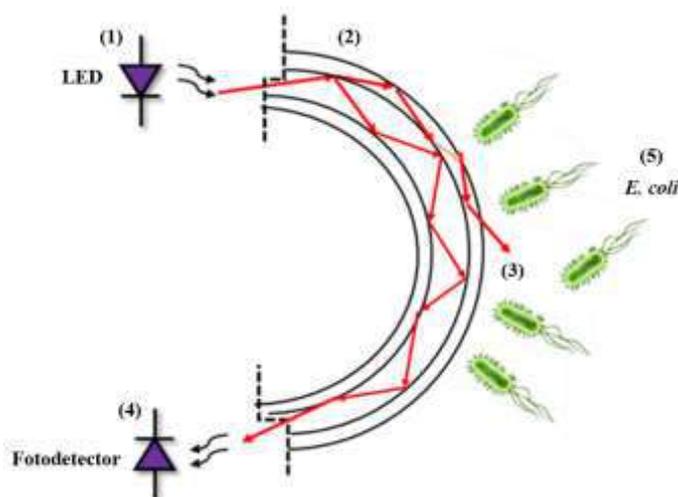


Figura 12 – Ilustração do princípio de funcionamento do sensor em “U” por perda de luz na curva. Fonte: Adaptado LIF.

Conforme demonstra a Figura 12, a luz é injetada no núcleo da fibra por um LED (diodo emissor de luz) (1). Os modos de propagação de ordem superior incidem na superfície curva da interface núcleo-casca com ângulo menor que o crítico e parte da luz é transferida para a casca por refração (2). Na casca, o mesmo fenômeno acontece, parte da luz é transferida para o meio externo por refração e parte permanece confinada na casca, podendo retornar ao núcleo (3). A luz que chega na outra extremidade da fibra é detectada por um fotodiodo (4). A quantidade de luz que é perdida na transmissão depende da variação do índice de refração do meio em torno da curvatura da fibra (5). Se o sensor em “U” imobilizado com anticorpos específicos estiver imerso em uma suspensão contendo bactérias, por exemplo, o índice de refração vai aumentar com a concentração de bactérias capturadas na superfície da fibra e conseqüentemente, a perda de luz vai ser maior. Portanto, com este princípio é possível medir a concentração de bactérias em soluções aquosas.

2.2 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR)

A fração da luz absorvida por um objeto é função da excitação dos elétrons em virtude da separação entre níveis de energia eletrônica do material que constitui o mesmo. Todavia, para objetos de dimensões nanométricas, a cor é originada pelo fenômeno conhecido como plasmon. Esse é o motivo pelo qual as cores dos objetos variam quando em escala nano, como é o caso do vermelho das nanopartículas de ouro e do amarelo das nanopartículas de prata, por exemplo.

Um plasmon pode ser entendido como uma onda proveniente da oscilação coletiva de elétrons em um material. No caso de metais, essa onda se propaga em sua superfície dando origem ao termo: plasmon de superfície.

A interação da luz com a superfície de um metal de espessura nanométrica sob determinadas condições resulta na separação de cargas elétricas na superfície do filme metálico, em função da oscilação coletiva dos elétrons. Por períodos muito curtos de tempo, os elétrons acumulam-se mais em um lado da superfície do que no outro gerando uma frequência de oscilação dos elétrons na superfície, conforme ilustrado na Figura 13. Caso essa frequência de oscilação seja igual à frequência da radiação elétrica incidente, chega-se à condição de ressonância plasmônica.

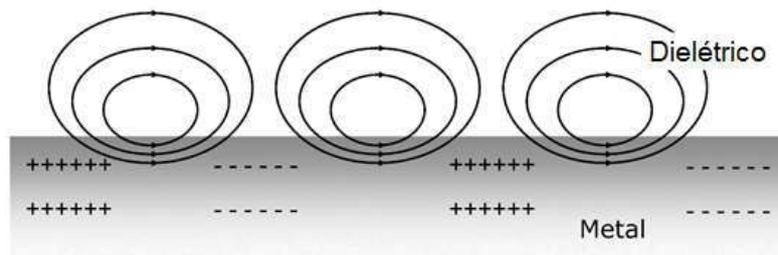


Figura 13 – Ilustração dos campos elétricos formados pela ressonância plasmônica na superfície de um metal. Fonte: <<http://www.ucd.ie/biophysics/surfaceplasmons.html>>. Acesso em 30 jan. 2017.

Para que a interação entre a luz e a superfície metálica gere o fenômeno de ressonância plasmônica, as seguintes condições devem ser atendidas:

- O filme metálico deve estar entre dois meios dielétricos, sendo que o índice de refração do dielétrico por onde se propaga a luz incidente deve ser maior do que o do dielétrico do outro lado do filme;
- A luz deve incidir na superfície do filme metálico com ângulo maior que o crítico, de modo que haja reflexão interna total. Nessa condição, é gerado um campo evanescente perpendicular à interface metal-dielétrico que é responsável por excitar o plasmon de superfície;
- A depender do comprimento de onda da luz incidente, o plasmon entra em ressonância resultando na absorção máxima da luz;
- O tipo do metal também é importante. A prata apresenta maior absorção, (TROUILLET, *et al.*, 1996), contudo o ouro é mais utilizado por sua maior estabilidade química e por não oxidar tão facilmente como a prata;
- A espessura do filme deve ser menor que o alcance do campo evanescente.

A aplicação do fenômeno de ressonância plasmônica em sensoriamento tem sido muito promissora, principalmente na área Biomédica, devido à sua enorme sensibilidade à variação do índice de refração do meio. Ademais, o fenômeno produz intensas oscilações eletrônicas na superfície do filme metálico mesmo para uma luz incidente de baixa intensidade.

Nos últimos anos, a tecnologia de biossensores baseada em SPR tem obtido grande sucesso devido à sua alta sensibilidade. A configuração mais utilizada para sensoriamento por SPR é a de *Kretschmann*, ilustrada na Figura 14.

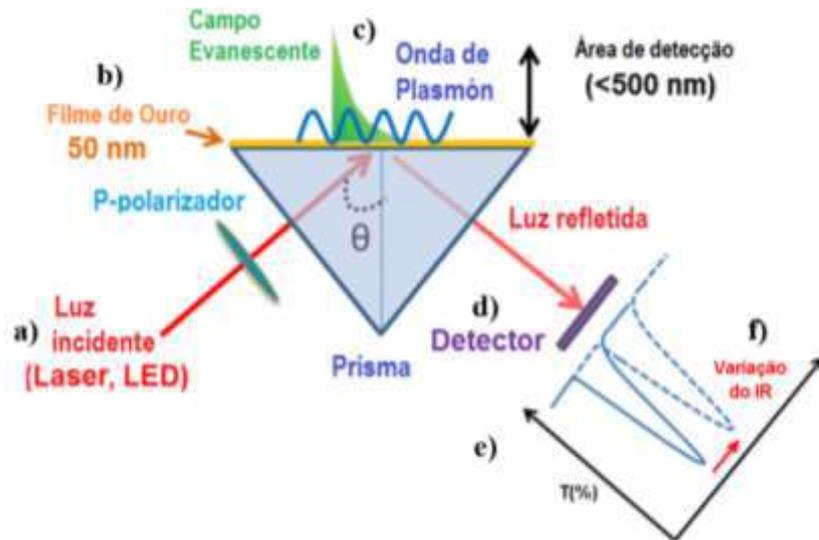


Figura 14 – Sensoriamento por SPR – Configuração de *Kretschmann*. Fonte: Adaptado de YANASE *et al.* (2016). a) Fonte de luz; b) filme de ouro; c) Ressonância produzida; d) Detector; e) espectro; f) resposta do espectro frente as mudanças do índice de refração do meio.

Observando a Figura 14, luz policromática (a) incide em determinado ângulo fixo sobre a interface de um prisma e um filme metálico, geralmente um filme fino de ouro (b) com 50 nm de espessura. Um feixe de luz excita oscilações coerentes dos elétrons da banda de valência (c) causando uma absorção de potência da luz que é mensurada pelo detector (d). Se o ângulo incidente é fixo e a luz policromática, a ressonância causa uma absorção máxima em apenas um determinado comprimento de onda. Através de um espectrômetro (e) é possível detectar em qual frequência ocorre a absorção máxima da luz refletida. Ao aumentar o índice de refração do meio, a absorção máxima ocorre em um comprimento de onda maior, ou seja, o ponto de mínimo no espectro de transmissão desloca-se para o vermelho (f). Esse é um método de detecção por modulação em frequência (JONES e SPILLMAN, 2002; HOMOLA *et al.*, 1999).

Existe uma alternativa que consiste em utilizar uma fonte de luz com comprimento de onda fixo e variar o ângulo de incidência sobre a interface metal-dielétrico. Sendo assim, o ponto de mínimo desloca-se em função do ângulo de incidência, e neste caso, o método aplicado é o de modulação por ângulo.

O SPR pode ser aplicado às fibras ópticas e para isso é necessário retirar a casca da fibra e depositar um filme metálico sobre o núcleo exposto, conforme Figura 15. Além dos métodos de detecção por modulação de frequência ou de ângulo, também é possível utilizar a modulação por intensidade, que é mais simples e requer uma eletrônica de menor custo.

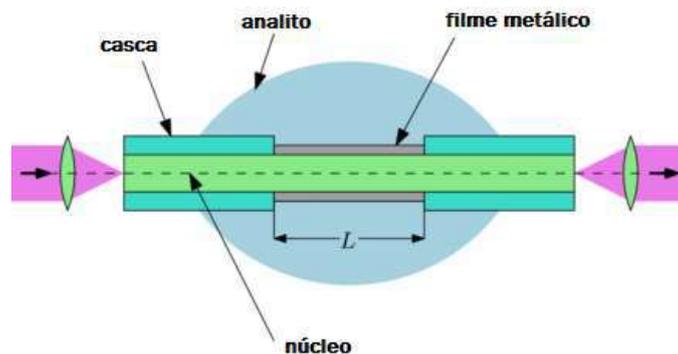


Figura 15 – Exemplo de uma configuração para sensoriamento por SPR em fibra óptica reta. Fonte: Adaptado de CIPRIAN e HLUBINA (2013).

2.3 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR)

Se na interface metal-dielétrico o filme metálico for substituído por nanopartículas, o fenômeno de ressonância não tem como se propagar pela superfície e permanece localizado. A esse fenômeno dá-se o nome de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) e apresenta como grande vantagem, não depender do ângulo de incidência da luz (CAMARA, 2015).

2.4 INCERTEZA DE MEDIÇÃO E CALIBRAÇÃO

Este tópico trata do cálculo da incerteza da medição, do processo de calibração dos sensores em sacarose e apresenta também alguns conceitos de metrologia.

2.4.1 FUNDAMENTOS DO CÁLCULO DE INCERTEZA

Qualquer instrumento ou técnica de medição, por melhor que seja, é incapaz de medir o valor verdadeiro de uma grandeza física. Portanto, o valor medido é sempre um valor aproximado, e sendo assim, qualquer medição física deve incluir uma estimativa do erro cometido, (MENDES e ROSÁRIO, 2005).

Esses erros são de dois tipos: sistemáticos e aleatórios. Os erros sistemáticos são devidos a causas identificáveis e podem em princípio ser eliminados pela calibração ou manutenção do instrumento, enquanto que os erros aleatórios são oriundos da natureza do processo e não podem ser eliminados. Por isso, é de extrema importância conhecer esses erros e declará-los em conjunto com o valor medido (MENDES e ROSÁRIO, 2005).

Os erros aleatórios representam a dispersão do valor medido em torno de um valor médio, que nada mais é do que a capacidade do instrumento em repetir uma medida sob

mesmas condições de operação, o que é conhecido como repetibilidade, (ISO GUM, 2008).

Em suma, a dispersão das medidas de um instrumento introduzida por erros aleatórios reflete a falta de conhecimento associado ao valor da grandeza a ser medida, o que é também definido como a incerteza de medição.

A ISO GUM (2008) recomenda dividir as componentes de incerteza em dois tipos: incerteza padrão do Tipo A e incerteza padrão do Tipo B, com o propósito de indicar duas maneiras diferentes de cálculo da incerteza. Ambas são baseadas em distribuições de probabilidade e são quantificadas por um desvio padrão.

Uma incerteza do Tipo A é obtida a partir de uma série de observações repetidas n vezes, cujo valor médio é representado por \bar{x} . A dispersão dessas medidas é representada pelo desvio padrão da média, calculada pela Equação 3 (MENDES e ROSÁRIO, 2005; PIMENTEL, 1995), onde s é o desvio padrão, calculado pela Equação 4 (MENDES e ROSÁRIO, 2005; PIMENTEL, 1995).

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (3)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \quad (4)$$

Uma incerteza do Tipo B é obtida por julgamento específico baseado em informações prévias de medição, experiência ou conhecimento geral do comportamento e propriedades dos instrumentos, especificações do fabricante e informações de certificados de calibração. É reconhecido que uma avaliação da incerteza pelo Tipo B pode ser tão confiável quanto a do Tipo A, especialmente na situação em que a avaliação do Tipo A é baseada na comparação de pequenos números de observações estatisticamente independentes (ISO GUM, 2008).

Quando um determinado resultado é obtido através da medida de várias grandezas, o cálculo de sua incerteza deve considerar a lei de propagação de incerteza, onde os desvios padrão de cada medida devem ser combinados. A essa incerteza, dá-se o nome de incerteza padrão combinada, representada por $u_c(y)$ e é a raiz quadrada positiva da variância combinada. A expressão para se determinar a incerteza padrão combinada no caso não correlacionado é apresentada pela Equação 5 (ELLISON *et al.*, 2002; PIMENTEL, 1995).

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i) \quad (5)$$

Em que $u(x_i)$ é a incerteza padrão associada à grandeza de entrada x_i . As derivadas parciais $\left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)$ calculadas no ponto x_i são denominadas coeficientes de sensibilidade, pois descrevem como a estimativa de y varia com pequenas mudanças nos valores das estimativas das grandezas de entrada x_1, x_2, \dots, x_N , (ELLISON *et al.*, 2002; PIMENTEL, 1995).

Geralmente na indústria e nas áreas da saúde e segurança, a fim de aumentar o nível de confiança das medidas, utiliza-se a incerteza expandida, que é obtida multiplicando-se a incerteza padrão combinada por um fator de abrangência que depende do tipo de distribuição de probabilidade da grandeza de saída (normal, *t-Student*, entre outras) e do nível de confiança requerido para o intervalo. Para uma distribuição normal, é prática comum na indústria utilizar o fator k igual a 1,96 ou 2, e significa que a estimativa é 95 % ou 95,45 % confiável, respectivamente. Entretanto, se o número de amostras for menor do que 30, recomenda-se o uso da função de distribuição *t* de *Student*, e neste caso, o fator k para um nível de confiança de 95 % ou 95,45 % vai depender do grau de liberdade das amostras (número de determinações independentes).

2.4.2 CALIBRAÇÃO

Após a fabricação de um sensor, é necessário calibrá-lo. O processo de calibração consiste em duas etapas: primeiro, uma série de medidas são realizadas com padrões analíticos do mensurando de valores conhecidos para a construção de um modelo que correlacione a grandeza medida com o sinal de saída do sensor. Na segunda etapa, usa-se o modelo para indicar os valores de novas amostras em função do sinal de saída do sensor.

A calibração tem como resultado a curva de calibração, que consiste na relação entre o sinal de saída do sensor e a variação do mensurando. A curva de calibração é construída de modo a passar mais próxima possível dos pontos experimentais. Isso é realizado através do método dos mínimos quadrados para uma regressão linear, Equação 6.

$$y = mx + b \quad (6)$$

Os coeficientes angular (m) e linear (b) são calculados pelas Equações 7 e 8 (PIMENTEL, 1995).

$$m = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad (7)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 \sum_{i=1}^n y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad (8)$$

Uma vez utilizado o método dos mínimos quadrados para ajuste da reta dos pontos experimentais, os desvios padrão dos valores dos coeficientes angular (m) e linear (b) da equação da reta são obtidos pelas Equações 9 e 10 (PIMENTEL, 1995).

$$sm = \frac{sy}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n x_i^2}} - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \quad (9)$$

$$sb = sy \sqrt{\frac{1}{n - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2}}} \quad (10)$$

O desvio padrão da Equação 6 é calculada pela Equação 11, (PIMENTEL, 1995).

$$s(y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n}}{(n-2)} - m^2 \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}} \quad (11)$$

2.5 REGRESSÃO INVERSA

A curva de calibração representa a relação que existe entre o sinal de saída do sensor e a concentração do analito, e através dela é possível conhecer o valor de saída do sensor em função de qualquer valor do analito, dentro do intervalo de confiança. O que se deseja ao se utilizar um sensor, no entanto, é o oposto: usar a curva de calibração para prever o valor de concentração do analito em função do sinal de saída do sensor, e ter uma estimativa da incerteza associada a essa previsão. Para isso, deve-se fazer a regressão inversa x_r , representada pela Equação 12 (PIMENTEL, 1995).

$$x_r = \frac{(y-b)}{m} \quad (12)$$

O cálculo da incerteza da regressão inversa é dada pela Equação 13 (PIMENTEL, 1995).

$$s(x_r) = \sqrt{\left(\frac{1}{m}\right)^2 \times s(y)^2} \quad (13)$$

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este item apresenta os materiais utilizados e a metodologia empregada para desenvolvimento desta pesquisa.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO OPTOELETRÔNICA

Os testes com os sensores foram realizados com dois *setups* optoeletrônicos distintos. Isso porque um dos *setups* apresentou uma sensibilidade menor do que a esperada. O princípio de funcionamento de cada um está descrito a seguir.

3.1.1 *SETUP* 1 – MICROCONTROLADOR ARDUÍNO

O *setup* 1 consiste de um circuito optoeletrônico projetado com um microcontrolador Arduino. A fonte de luz é um LED de 880 nm de arseniato de gálio e alumínio (AsGaAl). O receptor é um fotodiodo. O Arduino se comunica com um microcomputador através da porta USB.

O circuito permite a leitura simultânea de dois sensores, o que permite usar um sensor sem imobilização como referência e outro imobilizado com anticorpos da bactéria para efeito comparativo. Um diagrama de bloco do circuito do *setup* 1 é vista na Figura 16. Fotos do circuito optoeletrônico do *setup* 1 são vistas na Figura 17.

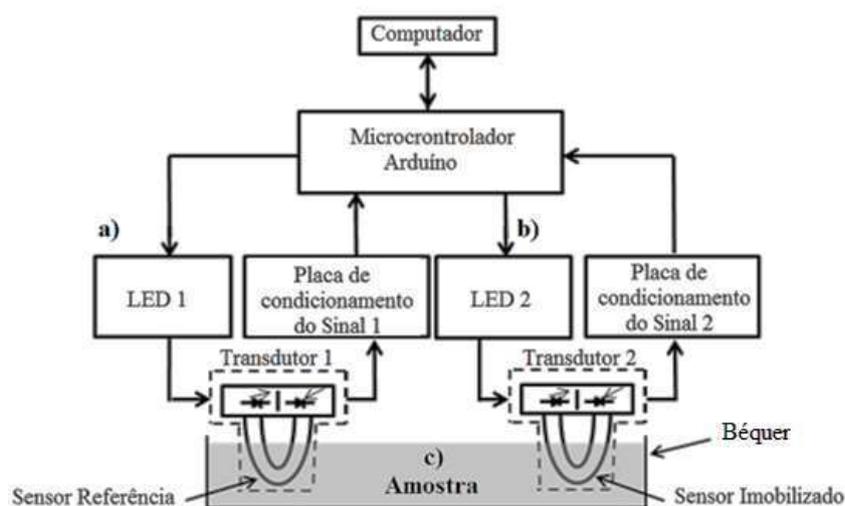


Figura 16 – Diagrama de blocos do circuito optoeletrônico do *setup* 1; a) LED 1 emissor de luz para o sensor de referência; b) LED 2 emissor de luz para o sensor imobilizado; c) Amostra com bactéria. Fonte: Adaptado de WERNECK *et al.*, 2016.



Figura 17 – a) Foto do sensor em teste; b) Foto do circuito optoeletrônico do *setup* 1.

3.1.2 *SETUP* 2 – ESPECTRÔMETRO PORTÁTIL

A fim de pesquisar por maiores sensibilidades, foi utilizado um segundo *setup*, que consiste de um analisador de espectro óptico (OSA) portátil, ou espectrômetro. Neste *setup* 2, o sensor foi conectado a uma fonte de luz branca (HL-2000, Ocean Optics), conforme apresentado na Figura 18.a e ao espectrômetro (HR-4000, Ocean Optics), visto na Figura 18.d. A coleta de dados foi feita pelo *software* de aquisição de dados SpectraSuite, visto na Figura 18.e. Fotos do *setup* 2 montado em bancada estão na Figura 18. Uma representação do circuito do *setup* 2 é vista na Figura 18 (à direita).



Figura 18 – (à esquerda) Montagem em bancada dos instrumentos que compõem o *setup* 2: a) fonte de luz branca; b) sensor no suporte; c) agitador magnético; d) espectrômetro; e) *software* SpectraSuite; f) suspensão de bactéria; g) sensor em “U” imobilizado preso no suporte. (à direita) Ilustração simplificada do *setup* 2.

3.2 FABRICAÇÃO DOS SENSORES

Os sensores usados nos *setups* 1 e 2 foram fabricados usando fibra óptica plástica do tipo multimodo (Mitsubishi Rayon Eska GH 4001), sem capa de proteção, com 1 mm de diâmetro, sendo 980 μm de núcleo e 20 μm de casca.

3.2.1 MOLDAGEM DAS FIBRAS EM FORMA DE “U”

A fibra foi cortada em trechos de 10 cm que foram colocados no dispositivo da Figura 19.a, responsável por moldar a fibra em forma de “U” com 8 mm de diâmetro, Figura 19.c. A forma de molde foi construída pelo grupo do Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF) para essa função específica. Após instalado na forma, os trechos de fibra foram aquecidos por 15 segundos com uma sopradora de ar quente, Figura 19.b. Durante o procedimento de moldagem, a temperatura foi monitorada e mantida inferior a 70 °C não atingido assim o ponto de fusão da fibra.



Figura 19 – Equipamento empregado na moldagem da fibra óptica plástica. a) Forma para molde da fibra em “U” desenvolvida pelo LIF. b) Detalhes da sopradora de ar quente utilizada para aquecer os trechos de fibra e moldá-los em forma de “U” e da ventoinha utilizada para resfriar todo o conjunto; c) Medida do diâmetro do sensor em “U”.

3.2.2 DEPOSIÇÃO DO FILME DE OURO

Após o molde em “U”, os sensores foram limpos em álcool isopropílico P.A. (Puro para Análise) por 2 minutos (não excedendo este tempo para não trincar a fibra), e em seguida, foram lavados em água ultrapura e secos com gás nitrogênio ultrapuro. Em seguida as fibras foram fixadas em um suporte de acrílico preparado para esta finalidade e presas à câmara de deposição com as curvas dos sensores viradas para baixo, Figura 20.a.

Uma camada de filme de ouro de espessura nanométrica foi depositada sobre os sensores através da técnica de pulverização catódica por radiofrequência (RF) em *Magnetron Sputtering* (Aja International), Figura 20.b.

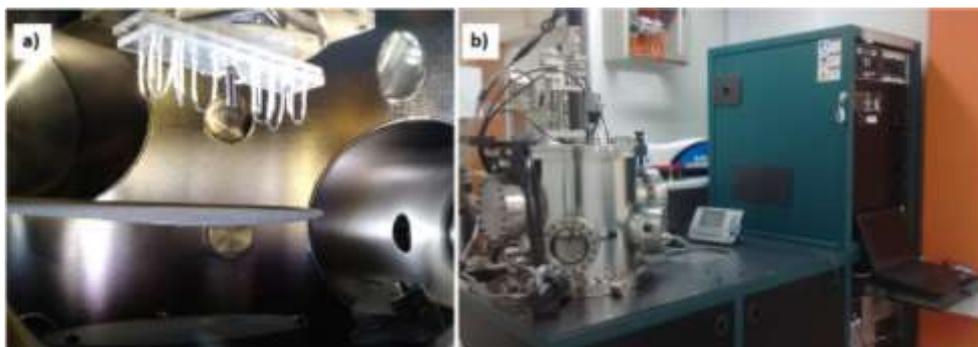


Figura 20 – *RF Magnetron Sputtering*. a) Fibras em “U” instaladas na câmara do *sputtering* para deposição dos filmes de ouro; b) Foto do equipamento instalado no LIF.

A técnica de pulverização catódica (*sputtering*) permite uma deposição uniforme, a baixas temperaturas o que favorece seu uso em substratos com baixo ponto de fusão como as fibras ópticas plásticas (TATSCH, 2000).

3.2.3 CLIVAGEM E POLIMENTO

Após deposição, as extremidades dos sensores foram clivadas de modo que a face da fibra permanecesse plana e perpendicular ao eixo longitudinal. Para isso foi utilizado um clivador desenvolvido pelo LIF especialmente para esta aplicação, Figura 21.a (WANDERMUR *et al.*, 2013). Após o corte, as faces das extremidades clivadas foram polidas com lixa de óxido de alumínio de 3 μm , Figura 21.b com movimentos em forma de “8” para eliminar possíveis imperfeições que pudessem resultar em desvios indesejáveis da luz.

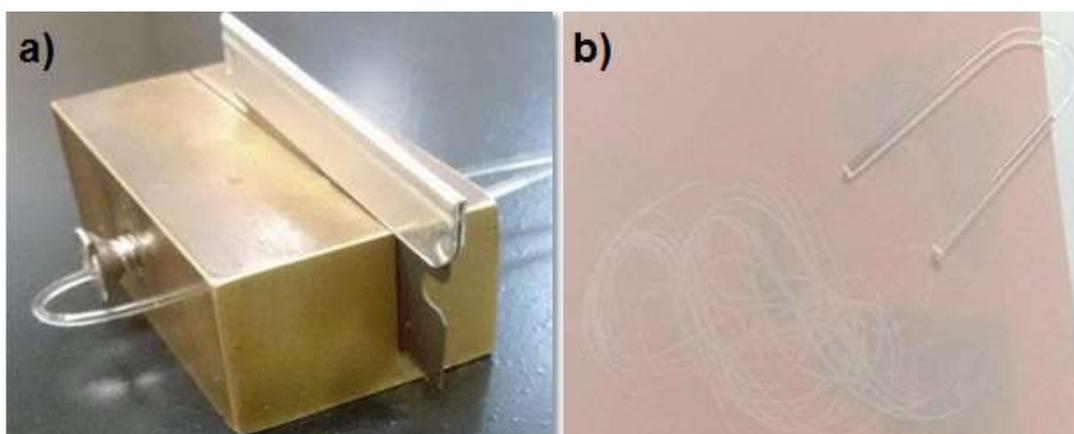


Figura 21 – a) Clivador de POFs de 1 mm desenvolvido pelo LIF com controle de altura; b) Marcas em forma de “8” sobre a lixa de 3 μm de óxido de alumínio após polimento das extremidades do sensor em “U”.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO FILME DE OURO

Este item apresenta as técnicas de caracterização utilizadas para a medida da espessura da deposição e da transparência do filme de ouro.

3.3.1 MEDIDA DA ESPESSURA

Para a deposição dos filmes de ouro foram definidos os seguintes parâmetros de operação do *sputtering*: potência do plasma em 40 W, pressão do argônio em 3 mtorr, vazão do argônio de 12 cm³/min em condições padrão de temperatura e pressão, substrato instalado a uma altura do suporte de 55 mm com uma rotação de 20 rpm. Essa configuração seguiu as recomendações do fabricante e foi repetida em todas as deposições realizadas neste trabalho.

A espessura da camada de ouro foi estimada em função da taxa de deposição do *sputtering*. Para confirmação do resultado, utilizou-se a própria coloração do filme, uma vez que para camadas iguais ou inferiores a 10 nm, o filme de ouro é azulado, acima disso é dourado translúcido até ficar completamente reflexivo para espessuras maiores que 70 nm, (CAMARA, 2015; CHRISTOPHER *et al.*, 2017; VIEIRA, 2002).

A taxa de deposição do ouro pelo *sputtering* era desconhecida e teve que ser determinada. Para filmes acima de 50 nm, foi possível medir a espessura dos filmes por perfilometria com uma boa precisão. Para filmes mais finos, foi utilizada a técnica de medição indireta por transmitância óptica.

Filmes de ouro foram depositados em lâminas de vidro lisas e lapidadas de 1 mm de espessura e 26 mm de comprimento por 76 mm de largura, usadas em microscopia óptica. Essas lâminas foram limpas com água ultrapura seguido de banho de ultrassom com álcool isopropílico P.A. Para a remoção de possíveis contaminantes orgânicos, foram imersas em solução “piranha” durante 30 minutos a temperatura ambiente com as concentrações de 1:4 em volume de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 35 % e de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 95 % , (FU *et al.*, 2009; SUO *et al.*, 2012).

Os filmes foram depositados em duplicate durante os seguintes tempos de deposição: 3, 5, 10, 15, 20, 25 e 28 minutos. Para a criação de um degrau que permitisse a medição com o perfilômetro, lamínulas de vidro foram presas às lâminas com Parafilm.

As espessuras dos filmes com tempo de deposição de 15, 20 e 25 minutos foram obtidas através do perfilômetro DektakXT (Brukers), Figura 22.a do Laboratório de Superfície e Filmes Finos do Programa de Engenharia de Materiais e Metalurgia da COPPE/UFRJ.

A espessura dos filmes foi obtida pela média das medidas em três posições da lâmina: lateral esquerda, centro e lateral direita. Em cada ponto foram realizadas 5 medidas.

Com a espessura dos três filmes foi possível ajustar uma reta aos pontos por regressão linear, que representa a espessura do filme de ouro depositado pelo *sputtering* em função do tempo. A taxa de deposição é a derivada dessa equação.

A espessura dos filmes de 3, 5 e 10 minutos de deposição foram medidas de forma indireta através da transmitância pelo equipamento F2-RT (Filmetric), Figura 22.b. As amostras foram enviadas para a empresa nos EUA.

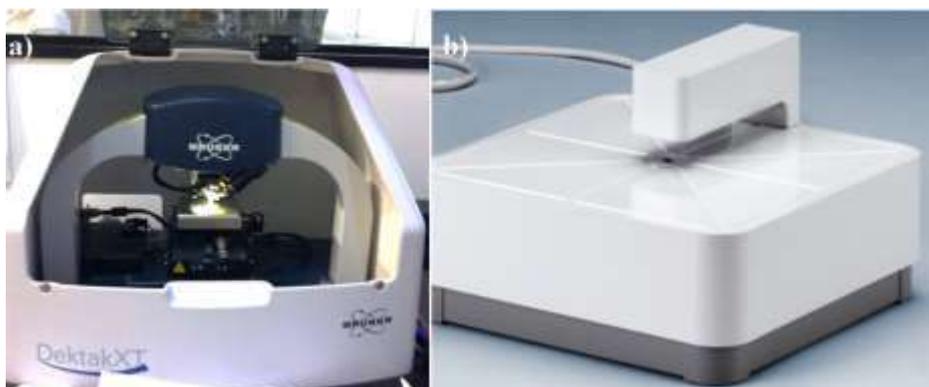


Figura 22 – a) Perfilômetro DektakXT utilizado para medir a espessura dos filmes de ouro do Laboratório de Superfície e Filmes Finos; b) Foto de um modelo do equipamento F2-RT igual ao que foi utilizado para medida indireta da espessura do filme de ouro por transmitância. Fontes: BRUKKER e FILMETRICS.

A espessura foi determinada usando o *software* aRTie, que produz um espectro de transmitância do filme para um determinado comprimento de onda, e compara com espectros de filmes de ouro de várias espessuras em um banco de dados. Como critério de verificação da qualidade do ajuste, foram considerados valores de GOF (do inglês *Goodness-of-fit*) maiores que 0,95. O método GOF é um número entre 0 e 1, onde quanto mais próximo de 1, melhor é o ajuste (OLIVARES e FORERO, 2010).

3.3.2 MEDIDA DA TRANSMITÂNCIA

Medidas de transmitância óptica dos filmes de ouro foram realizadas com o objetivo de conhecer a transparência de cada filme na faixa do ultravioleta, da luz visível e do infravermelho próximo, e saber se a luz seria capaz de atravessar o filme e interagir com o meio externo. Essa informação permite também confirmar as medidas das espessuras dos filmes através da comparação com os dados da literatura sobre espectrofotometria, assim como faz o *software* aRTie.

Filmes de ouro com 3,5, 7, 10, 18, 30, 50 e 70 nm de espessura foram depositados, em duplicata sobre lâminas de vidro de 1 cm de largura por 4,5 cm de comprimento. Com essas medidas, foi possível colocar as lâminas dentro de cubetas de tamanho padrão.

As medidas de transmitância foram realizadas no espectrofotômetro *Evolution 300* (Thermo Scientific) do Laboratório de Superfície e Filmes Finos do Programa de Engenharia de Materiais e Metalurgia da COPPE/UFRJ na faixa dos comprimentos de onda de 390 a 1000 nm.

3.4 CALIBRAÇÃO DOS SENSORES EM SOLUÇÕES DE SACAROSE

Inicialmente, os sensores foram testados em soluções aquosas de sacarose para verificar sua capacidade de medir o índice de refração dentro da faixa esperada de operação. Com esses resultados, foi possível levantar a curva de calibração e sua regressão inversa, conhecer a sensibilidade do sensor, a influência da camada de ouro no seu comportamento, e se sua resposta é linear, além de permitir o cálculo do desvio padrão e das incertezas das medidas.

Diferentes quantidades de sacarose foram solubilizadas em 10 mL de água ultrapura e colocadas em tubos de ensaio de 15 mL e misturadas por agitação centrífuga. Os índices de refração das soluções de sacarose foram medidos com um refratômetro Abbe de bancada com comprimento de onda de 589 nm, em uma sala com a temperatura ambiente controlada entre 25,0 e 25,5 °C. Foram preparadas soluções com concentrações de sacarose que resultassem em índices de refração na faixa de 1,33 a 1,39 que é equivalente a faixa de detecção da bactéria como demonstrados na Tabela 2.

Esses resultados são compatíveis com os valores encontrados por Bryant *et al.* (1969) e Beres *et al.* (2011) que encontraram um índice de refração de 1,384 e 1,395 para a bactéria *E. coli* respectivamente. Foram feitos testes iniciais com o refratômetro que comprovaram boa repetibilidade, compatível com a incerteza do instrumento declarada pelo fabricante, de 0,0002 RIU.

Para cada espessura de ouro, assim como para os sensores sem revestimento, foram fabricados e testados pelo menos cinco sensores, com objetivo de comprovar a reprodutibilidade do processo e validar a tecnologia.

Tabela 2 – Resultados dos índices de refração medidos em refratômetro (Abbe, D = 589,3 nm) empregando suspensões bacterianas que foram aferidas usando a escala de *McFarland*.

Concentração da suspensão de bactéria	Índice de Refração (589 nm a 25,1 °C)
Água ultrapura	1,3332
<i>E. coli</i> 1,5 x 10 ⁴ UFC/mL	1,3341
<i>E. coli</i> 1,5 x 10 ⁶ UFC/mL	1,3342
<i>E. coli</i> 1,5 x 10 ⁸ UFC/mL	1,3343
<i>E. coli</i> pura	1,3896

3.4.1 TESTES COM O *SETUP* 1

Para os testes em soluções de sacarose, inicialmente os sensores foram limpos com álcool isopropílico por 2 minutos, em seguida, por água ultrapura.

Para os sensores de até 18 nm, foram utilizados os seguintes critérios:

- A tensão de saída do *setup* 1 foi previamente configurada para 4 V com o sensor imerso em água ultrapura (1,33). Toda a semicircunferência do “U” deve estar submersa.
- Para cada concentração, um total de 10 medidas foram realizadas. Para o cálculo da incerteza expandida com 95 % de confiança para 10 amostras multiplicou-se a incerteza combinada por um fator de abrangência k que, para um grau de liberdade igual a 9, é de 2,26, segundo a distribuição t de *Student*;
- Os testes foram realizados em 8 soluções com índice de refração variando de 1,33 a 1,39, dentro da faixa de operação do sensor. O ajuste da reta aos pontos experimentais foi obtido por regressão linear simples;
- As concentrações das soluções de sacarose foram testadas aleatoriamente.

Para os sensores maiores que 30 nm de espessura, foi utilizada a seguinte metodologia:

- A tensão de saída foi previamente configurada para 3 V quando o sensor estiver em água ultrapura (1,33), uma vez que apresentaram sensibilidade positiva;
- Para cada concentração, um total de 20 medidas foram realizadas. Para o cálculo da incerteza expandida com 95 % de confiança para 20 amostras de uma população multiplicou-se a incerteza combinada por um fator de abrangência k que, para um grau de liberdade igual a 19, é de 2,09, segundo a distribuição t de *Student*;
- Os testes foram realizados em 5 soluções de sacarose com índice de refração variando de 1,33 a 1,39, além do ar (1) e glicerina (1,46), para melhor compreensão do comportamento do sensor em uma faixa mais ampla;
- As concentrações das soluções de sacarose foram testadas aleatoriamente.

3.4.2 TESTES COM O *SETUP* 2

Os sensores após limpos foram acoplados à fonte de luz branca e ao espectrômetro. Os testes foram realizados em 6 concentrações de soluções de sacarose, com índice de

refração variando de 1,33 a 1,39, além do ar (1,0) e da glicerina (1,46). O ajuste da reta aos pontos experimentais foi obtido por regressão linear simples. Com os dados experimentais foram calculados o desvio padrão da média, a incerteza padrão e a incerteza expandida para um nível de confiança de 95 % de cada medida de índice de refração. Para cada concentração, um total de 30 medidas foram realizadas.

3.5 IMOBILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS

A imobilização é o processo de adesão dos anticorpos da bactéria à superfície do sensor e tem como objetivo promover a seletividade à bactéria *E. coli*. É uma etapa chave na construção do biossensor e seu correto funcionamento depende essencialmente da orientação e homogeneidade dos anticorpos (HOCK *et al.*, 2002).

O anticorpo empregado neste estudo foi o *anti-Escherichia coli* policlonal IgG proveniente de coelhos (BIO-RAD). Optou-se pelo anticorpo policlonal devido ao seu menor custo em relação ao monoclonal (deriva de um único clone sendo, portanto, específico para um único sorotipo), e por reagir com os sorotipos *Escherichia coli* O157:H7, O20, O125, O55, O111 e K12.

O anticorpo atua por meio de dois sítios de reconhecimentos: a porção variável (Fab), responsável pela ligação aos antígenos (bactérias); e a região cristalizável ou constante (Fc), responsável pela variação de classe nos anticorpos (ANDERSON *et al.*, 1997) conforme ilustrado na Figura 23.

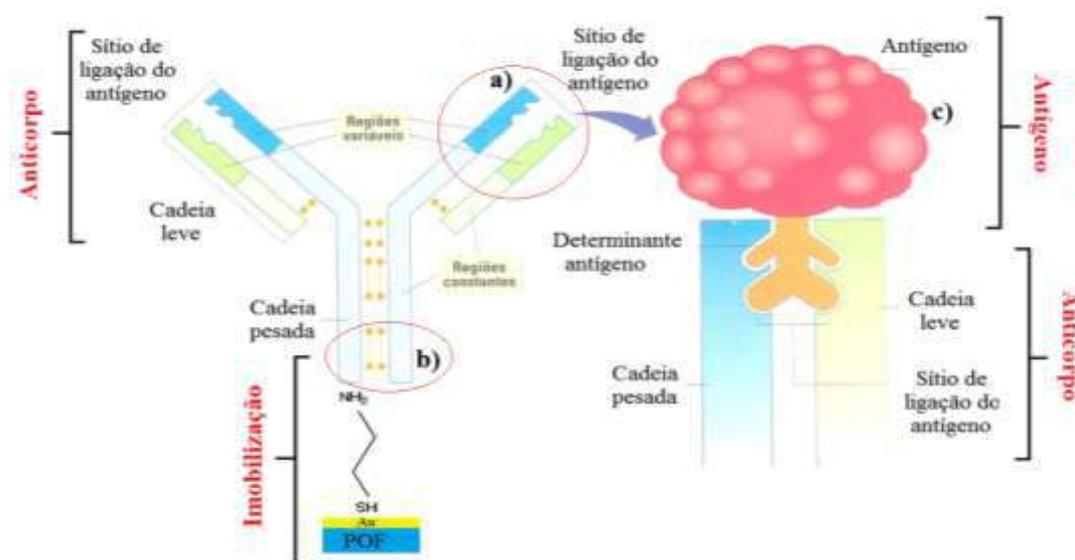


Figura 23 – Estrutura da molécula de anticorpo mostrando detalhes da região de ligação com o antígeno. a) Região correspondentes à porção variável (Fab) responsável por se ligar ao antígeno (bactéria); b) Região constantes ou cristalizável (Fc) responsável por se ligar à POF; c) Antígeno. Fonte: adaptado de <http://pt-br.aia1317.wikia.com/wiki/Anticorpos_e_Ant%C3%ADgenos_I>. Acesso em 31 jan. 2017.

Neste trabalho foram empregados protocolos de imobilização baseados em ligações covalentes formadas entre o filme fino de ouro e o anticorpo, por criar uma ligação forte favorecendo a estabilidade e a irreversibilidade da imobilização. Neste processo, utilizou-se a solução de cisteamina para a formação da ligação covalente. Esta estrutura apresenta um grupo terminal amina ($-NH_2$) que se liga ao anticorpo e outro grupo terminal tiol ($-SH$) que demonstra grande afinidade com superfícies de metais como o ouro através de interação do tipo quimiossorção (NIMSE *et al.*, 2014), Figura 24.

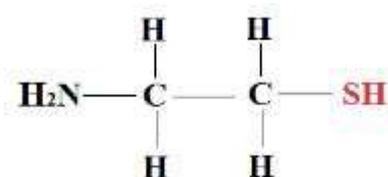


Figura 24 - Estrutura molecular da cisteamina.

Para o protocolo de imobilização foram necessários os seguintes reagentes: álcool isopropílico (C_3H_8O) 99,5 % (Synth) e empregado na limpeza dos sensores. Para o preparo da solução como ligante entre o filme de ouro e o anticorpo foram utilizados o álcool etílico absoluto (C_2H_6O) 99,5 % (Synth) e a Cisteamina 95 % (C_2H_7NS) (Sigma-Aldrich); A Solução Tampão fosfato (PBS) a 0,1 M e pH 7,4 (potencial hidrogeniônico) usadas na estabilização das soluções de anticorpo, no preparo das soluções de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-carbodiimida (EDAC) ($C_8H_{17}N_3.HCl$) e N-Hidroxisuccinimida (NHS) ($C_4H_5NO_3$) e na imersão dos sensores antes dos testes, foram preparadas empregando água ultrapura, cloreto de sódio P.A. (NaCl) e fosfato de sódio dibásico anidro P.A (Na_2HPO_4) com ajuste do pH para 7,4 usando soluções preparadas com ácido clorídrico (HCl) P.A. e hidróxido de sódio (NaOH) P.A. em escamas (todos da Synth).

Os reagentes responsáveis pela ativação dos grupos carboxílicos no anticorpo foram preparados usando uma solução de EDAC e NHS (ambos da Sigma-Aldrich).

A solução bloqueante empregada foi a Albumina de Soro Bovino (BSA) (Merck) usada na inativação das regiões do anticorpo que por ventura vieram a se ligar em sítios inespecíficos na superfície do sensor.

A suspensão bacteriana foi preparada usando água ultrapura e cloreto de sódio (NaCl) P.A. (Synth) e medidas em balança de precisão (BG 400, Gehaka). Durante os testes com o sensor houve a necessidade de serem testados dois protocolos de imobilização classificados por I e II diferenciando nas concentrações das soluções, tempo de contato e etapas dos procedimentos.

3.5.1 PROTOCOLO I DE IMOBILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS AO SENSOR

O protocolo I foi elaborado com base nos trabalhos desenvolvidos por ALEXANDRE *et al.* (2015), CAMARA *et al.* (2013), MIRANDA (2014), SATACH-MACHADO *et al.* (2010), e WANDERMUR *et al.* (2014). Algumas adaptações foram necessárias devidas às especificidades da POF com o filme fino de ouro. Conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes dos protocolos de imobilização de referência.

PROTOCOLO	SUBSTRATO	LIGANTE	IMOBILIZAÇÃO	BLOQUEIO
MIRANDA (2014)	Filme fino de ouro	Cisteamina 50 mM	EDAC e NHS a 25 mM Ac.	BSA 0,5 mg/mL
SATACH-MACHADO <i>et al.</i> (2010)	Filme fino de ouro	Cisteamina 10 mM	Ac. EDC 2 mM NHS 5 mM	BSA
ALEXANDRE <i>et al.</i> (2015)	Filme fino de ouro	Cisteamina 10 mM	Proteína A 7,5 mg/mL Ac.	-
CAMARA <i>et al.</i> (2013)	Nanopartículas de ouro	Cisteamina 50 mM	Ac.	Glicina 50 mM
WANDERMUR <i>et al.</i> (2014)	PMMA (POF)	HMDA 10 % Glutaraldeído 2,5 %	Proteína A Ac. 10 µg/mL	BSA 0,1%
PROTOCOLO I	Filme fino de ouro	Cisteamina 10 mM	EDAC 25 mM Ac. 10 µg/mL	BSA 0,1 %

Legenda: AuNPs: Nanopartículas de ouro; Au: ouro; POF: Fibra Óptica Plástica; Ac.: Anticorpo; EDAC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-carbodiimida; EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; NHS: N-Hydroxysuccinimide; BSA: Albumina de Soro Bovino.

Os sensores foram limpos com álcool isopropílico por 2 minutos e depois em água ultrapura. Em seguida as curvas dos sensores em “U” foram mergulhadas em um béquer de 5 mL contendo uma solução de cisteamina a 10 mM por 2 horas em capela de fluxo laminar previamente esterilizada e a temperatura ambiente (25 °C).

Decorrido o tempo de quimiossorção entre a cisteamina e o filme de ouro sobre o sensor é necessária a lavagem em álcool etílico absoluto para a remoção de moléculas fracamente adsorvidas conforme descrito por SATACH-MACHADO *et al.* (2010) seguido de lavagem em água ultrapura por até 2 vezes.

Para a ativação do grupo carbóxico (–COOH) provenientes das extremidades da região cristalizável (Fc) do anticorpo, foi preparada uma solução contendo EDAC a 25 mM com anticorpo a uma concentração de 10 mg/mL e deixada descansar por 15 minutos, antes da imersão da superfície curva dos sensores e deixados por 2 horas.

Decorrido este período, o sensor foi então mergulhado em solução de BSA 0,1 % por 30 minutos bloqueando possíveis ligações provenientes da cisteamina não

imobilizadas. Em seguida, os sensores foram lavados com solução de PBS por 3 vezes e deixados imersos na mesma solução até o momento do teste.

Após 6 horas de preparo, o sensor estava pronto para o teste em soluções de bactérias.

3.5.2 PROTOCOLO II DE IMOBILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS AO SENSOR

O protocolo II foi desenvolvido como método alternativo frente a necessidade de melhorar a adesão de bactérias sobre a superfície do sensor, com base nos trabalhos de CELIKKOL-AUDIN *et al.* (2014) que estudaram a eficiência da imunocaptura da *E. coli* O157:H7 em uma superfície de ouro imobilizada em função da concentração de anticorpos (Tabela 4).

Tabela 4 – Reagentes dos protocolos de imobilização de referência.

PROTOCOLO	SUBSTRATO	LIGANTE	IMOBILIZAÇÃO	BLOQUEIO
CELIKKOL-AUDIN <i>et al.</i> (2014)	Filme fino de ouro	MUA 4 mM	EDAC 100 mM NHS 40 mM Ac. <10 µg/mL	BSA
PROTOCOLO II	Filme fino de ouro	Cisteamina 4 mM	EDAC 100 mM NHS 40 mM Ac. 10 µg/mL	BSA 0,1 %

Legenda: Ac.:Anticorpo; EDAC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-carbodiimida; NHS: N-Hydroxysuccinimide; BSA: Albumina de Soro Bovino; MUA: 11-Mercaptoundecanoico.

CELIKKOL-AUDIN *et al.* (2014) apontam em seus estudos que a capacidade de captura das bactérias satura para uma concentração superior a 10 µg/mL de anticorpos, e que utilizar uma concentração maior é desperdício. Por este motivo optou-se pelo uso da mesma concentração.

Novamente, de modo a atender às características do sensor em “U” revestido com filme fino de ouro, o protocolos utilizados por CELIKKOL-AUDIN *et al.* (2014) foi adaptado para atender à especificidade da fibra de PMMA com ouro. Portanto utilizou-se uma concentração de Cisteamina de 4 mM como ligante entre o filme de ouro e o anticorpo da bactéria, em vez da solução de ácido 11-Mercaptoundecanoico (MUA). A Cisteamina é um reagente mais utilizado em procedimentos de imobilização de anticorpo sobre superfície de ouro (ALEXANDRE *et al.*, 2015; BACCAR *et al.* 2010; CAMARA *et al.*, 2013; ROUSHANI *et al.*, 2016; MIRANDA 2014; SATACH-MACHADO *et al.*, 2010).

As concentrações de EDAC a 100 mM e de NHS a 40 mM foram adotadas no protocolo II por terem apresentado melhor eficiência na ligação do anticorpo ao filme de

ouro, conforme verificado pelos autores por Espectroscopia de Fotoelétron de Raio-X (XPS).

Um teste preliminar com o Protocolo II foi realizado sobre um substrato de vidro contendo filmes de 70 nm para verificação da eficiência da imobilização, e foi constatada uma melhora na adesão da bactéria na superfície do filme de ouro.

O protocolo II consiste inicialmente na limpeza do sensor em álcool isopropílico P.A. por 2 minutos em água ultrapura seguido da total imersão do sensor em solução de cisteamina a 4 mM por 1,5 hora em capela de fluxo laminar previamente esterilizada e a temperatura de 20 °C.

Decorrido o tempo da quimiossorção (ligação entre a cisteamina com o filme fino de ouro) dos sensores foram lavados em álcool etílico absoluto seguido pelo enxague em água ultrapura por 2 vezes. Em seguida foram diluídos em PBS o EDAC a uma concentração de 100 mM e NHS a 40 mM sobre a superfície curva do sensor seguido da adição do anticorpo e deixados por 1 hora. Decorrido este período, a semicircunferência do sensor é então imersa em solução bloqueante de BSA por 30 minutos. Posteriormente, foram lavados em solução de PBS por 3 vezes e deixados imersos em PBS por até 2 horas antes do teste.

Após 7 horas de preparo o sensor estava pronto para teste em soluções de bactérias. Uma representação dos protocolos I e II é apresentado na Figura 25.

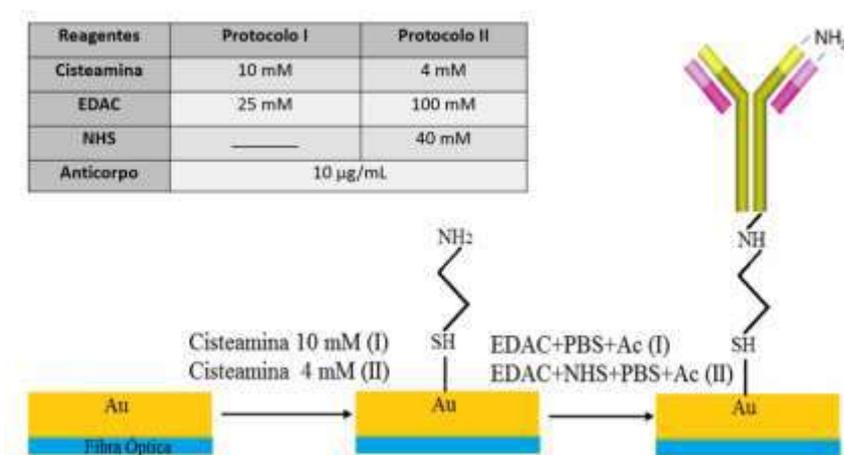


Figura 25 – Protocolo I e II de imobilização do anticorpo ao sensor. Fonte: Adaptado de CELIKKOL-AYDIN et al. (2014) e MOURA et al. (2014). Abreviaturas: EDAC: 3-(Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiâmina; NHS: N-hidroxissuccinimida; PBS: Solução Tampão Salina; Ac: Anticorpo

3.6 PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

As bactérias empregadas neste estudo foram as seguintes:

- *E. coli* O55 enteropatogênica (EPEC) – fornecidas pela Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) foram preparadas em meio de cultura em Ágar Triptona de Soja (TSA) previamente incubada durante 24 horas a 37 °C;
- *Enterobacter cloacae* e a *Salmonella typhimurium* cultivados em meio de cultura de Caldo Trípico de Soja (TSB) e em caldo de Ágar Triptona de Soja (TSA) respetivamente a uma temperatura de 35 °C. Essas amostras bacterianas foram fornecidas pelo laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ. Por serem bactérias Gram-negativas, assim como a *E. coli*, foram empregadas para a verificação da seletividade do sensor;
- *Bacillus subtilis* fornecidas pela (FIOCRUZ) foram cultivadas em caldo de Ágar Triptona de Soja (TSA) 25 °C e foram utilizadas como controle negativo, ou seja, por serem gram-positiva apresentam membrana celular com composições diferentes das gram-negativas ao qual a *E. coli* é integrante. Por este motivo os anticorpos presentes na superfície do sensor não se ligarão com as bactérias presentes no meio e portanto não poderá produzir alterações de medida do índice de refração em função do tempo.

As concentrações das suspensões bacterianas foram preparadas através do padrão de turbidez McFarland 0,5 por comparação visual (AZAR *et al.*, 2008). Este padrão consiste de soluções produzidas com ácido sulfúrico e cloreto de bário que, quando misturados, resultam em um precipitado de sulfato de bário com uma turbidez correspondente a uma suspensão de bactéria *E. coli* com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (MCFARLAND, 2010). A partir do padrão McFarland 0,5, outras concentrações foram obtidas por meio de diluição.

Por se tratar de um método de comparação visual e portanto sujeito a erros, as concentrações das soluções foram confirmadas através da medida da absorbância no espectrofotômetro (UV-1800, PRO-TOOLS), considerando que uma concentração equivalente a 0,5 da escala McFarland apresenta uma absorbância entre 0,08 e 0,1 para um comprimento de onda de 625 nm e caminho óptico de 1 cm (MCFARLAND, 2010; ESMERINO *et al.*, 2004; ZIBAI *et al.*, 2014). Todas as suspensões bacterianas foram preparadas utilizando uma solução constituída de cloreto de sódio a 0,85 %.

3.7 TESTES DO NANOBIOSENSOR NA DETECÇÃO DA BACTÉRIA

Os sensores a fibra óptica em “U” sem e com filmes de 10 nm e 70 nm de ouro foram escolhidos para a imobilização e testes de detecção de bactéria. A espessura de 10 nm foi escolhida por apresentar menor perda de sensibilidade, melhor adesão à superfície do sensor e maior resistência aos ataques químicos provenientes dos protocolos de imobilização dentre os sensores que funcionam pelo princípio de perda de luz na curva. A espessura de 70 nm foi escolhida por apresentar maior sensibilidade e linearidade dentre os sensores que funcionam pelo princípio de SPR.

3.7.1 SETUP 1

No *setup* 1 os sensores imobilizados de 10 e 70 nm foram acoplados ao sistema e testados e parametrizados inicialmente em solução salina a 0,85 %. Foram utilizados dois sensores: um sem imobilização para servir como sensor de referência, e o outro, o sensor imobilizado a ser testado com bactérias.

Os sensores foram imersos nas soluções de bactérias e os dados coletados em intervalos de 30 s ou 1 min por até 60 minutos sob agitação constante de 60 rpm. A medida da variação do índice de refração em função do tempo é dada em Volts (V).

3.7.2 SETUP 2

No *setup* 2 o sensor imobilizado de 70 nm foi testado e parametrizado inicialmente em solução salina a 0,85 %. Não foi possível utilizar um sensor de referência durante os testes. O sensor foi imerso nas soluções de bactérias e os dados coletados em intervalos de 5 min por até 60 minutos, sob agitação constante de 60 rpm. A medida da variação do índice de refração em função do tempo é dada por um espectro de transmitância (%) na faixa de comprimento de onda do ultravioleta e visível (UV-Vis).

3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS SENSORES COM BACTÉRIAS

Após os testes com bactérias, os sensores foram caracterizados para a análise minuciosa da captura das bactérias pelos anticorpos (imunocaptura) por microscopia óptica e microscopia eletrônica (MEV).

3.8.1 ÁREA DE COBERTURA DA BACTÉRIA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Os nanobiossensores, após os ensaios com bactérias, foram submetidos à solução de safranina (Reagen) por 5 segundos. Em seguida foram lavados com água ultrapura por

3 vezes e deixados secar à temperatura ambiente. Após a secagem, os sensores estão prontos para serem visualizados em microscópio óptico com aumento de 40 vezes ou por imersão em óleo natural mineral com lente objetiva de 100 vezes. Este procedimento de coloração é importante pois o corante adere à parede das bactérias Gram-negativas apresentando coloração vermelha permitindo a visualização em microscópio óptico.

Imagens foram produzidas com o uso de uma câmera fotográfica de 13 megapixels. Estimativas da área de cobertura de bactérias foram obtidas com o auxílio do *software* ImageJ.

3.8.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MEV

A captura das bactérias pelos anticorpos foi observada no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do Programa de Engenharia de Materiais e Metalurgia do Centro de Tecnologia PEMM/UFRJ/COPPE e também no do Centro de Microscopia (CENABIO) do Centro de Ciências da Saúde CCS/UFRJ.

Para que as amostras biológicas possam ser visualizadas sem sofrerem alterações em sua estrutura morfológica quando submetidas ao MEV, foi necessária a aplicação de um protocolo de preparo das amostras conhecido como secagem em Ponto Crítico.

No processo de microscopia a amostra não pode conter água. A secagem natural de uma amostra biológica, ou seja, secagem pela exposição ao ar, devido à transição de fase da água do estado líquido para o gasoso, as células sofrem uma tensão superficial que destrói sua estrutura (BAL-TEC, 1997), como pode ser visto no exemplo da Figura 26.

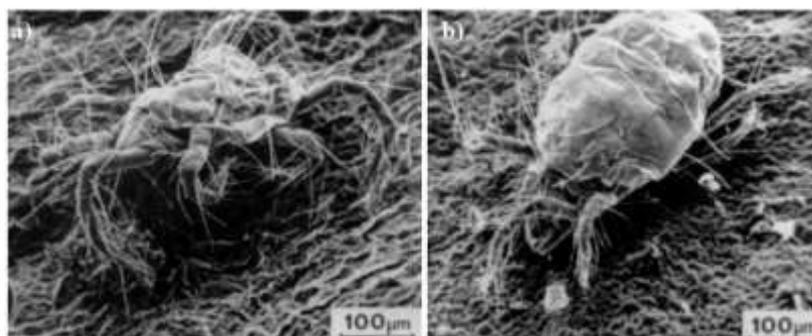


Figura 26 –Micrografia produzidas em MEV de uma aranha ampliada 145x. a) Imagem do inseto após secagem ao ar. b) Imagem do inseto após secagem em ponto crítico. Fonte: Adaptado de BAL-TEC, (1999).

Na secagem a Ponto Crítico, a amostra é preenchida com CO₂ líquido e submetida a um processo controlado de aumento da temperatura e pressão de modo que o CO₂ atinja o seu estado supercrítico e em seguida a pressão é reduzida até que o CO₂ esteja em seu

estado gasoso. Ao fim, o CO₂ é liberado para a atmosfera e a amostra biológica está seca e com toda sua estrutura morfológica preservada.

O Diagrama de Fases da Figura 27 mostra as várias fases do CO₂ em função da temperatura e pressão.

No ponto triplo (T), por exemplo, as três fases sólido-líquido-gasoso coexistem. Uma transição do estado líquido (ponto 1) para o estado gasoso (ponto 2) pelo caminho 3 representa uma secagem com transição de fase, e essa é danosa para as amostras biológicas. A secagem a Ponto Crítico é a transição do ponto (1) ao (2) pelo caminho 4, passando pelo estado supercrítico sem transição de fase e sem que a amostra seja submetida à ação da tensão superficial, (PANDITHAGE, 2012).

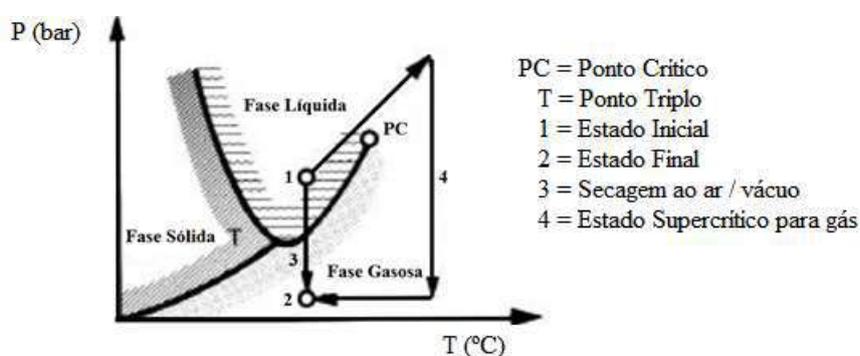


Figura 27 – Diagrama de fases do CO₂ e os caminhos das transições de fase da secagem ao ar/vácuo e secagem a Ponto Crítico. Fonte: adaptado de BAL-TEC, 1997.

A escolha do líquido para o ponto crítico leva em consideração a sua solubilidade em amostras biológicas. Na água, no etanol, com outros solventes presentes no meio, a pressão e a temperatura a serem empregadas para que não ocorra alterações significativas nas amostras (como ocorreriam caso o solvente fosse a água cuja pressão crítica) é extremamente elevada (220,9 bar e temperatura crítica de 374 °C). Por este motivo, o solvente mais utilizado é o dióxido de carbono, cujo Ponto Crítico ocorre na temperatura de 31 °C e pressão de 73 bar (BAL-TEC, 1997; KASHI *et al.*, 2014).

O protocolo de preparo das amostras para a secagem a Ponto Crítico consiste nos processos de: fixação, lavagem, desidratação e a secagem a Ponto Crítico. O processo de fixação consiste na imersão das amostras em solução preparada com Glutaraldeído a 2,5 % (Sigma-Aldrich) com a solução tampão fosfato dibásico misturados nas proporções de (1:10). O glutaraldeído é um fixador de amostras biológicas que apresenta efeito irreversível após a fixação quando incorporado à superfície (BEDINO, 2003).

Os sensores foram deixados imersos na solução fixadora por 24 horas a 4 °C. Em seguida os sensores foram lavados por 3 vezes em intervalos de 30 minutos com solução

tampão fosfato a 0,2 M (pH 7,4) onde passaram por sucessivas desidratações. Nesta etapa, a amostra é desidratada gradualmente com álcool etílico anidro (Synth) preparado nas concentrações de 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 % e 99,9 % por 20 minutos.

Ao término deste processo, os sensores permaneceram conservados em solução de álcool etílico 99,9 % até o momento de serem transferidos para a câmara do equipamento de secagem a Ponto Crítico (CPD 030 - BAL-TEC) do Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Figura 28.a.

Após a secagem, as amostras foram retiradas e colocadas em um suporte metálico com fita de carbono onde receberam um filme de 18 nm ouro depositadas por um *sputtering* (SCD500, Leica EM), Figura 28.d.

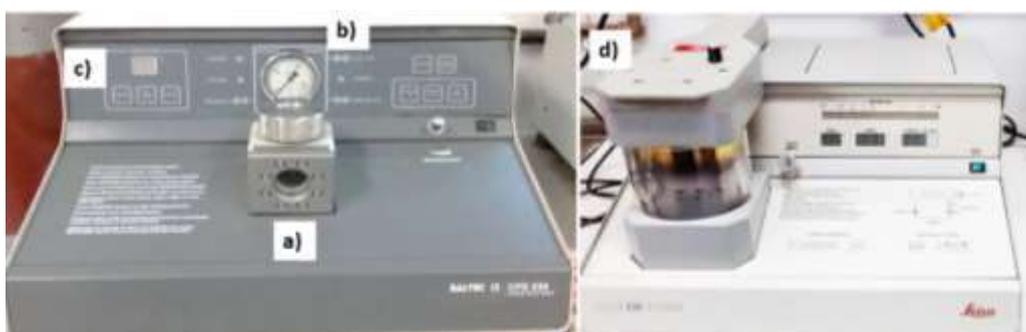


Figura 28 – (à esquerda) Equipamento CPD 030 (BAL-TEC) do laboratório de microbiologia da UFRJ. a) Câmara de ponto crítico; b) Manômetro; c) Indicador de temperatura. (à direita) Sputtering SCD 500 (Leica EM).

Após a retirada das amostras do *sputtering*, as mesmas estavam prontas para serem levadas ao MEV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados dos ensaios realizados seguindo os procedimentos e protocolos descritos no Capítulo 3.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO FILME FINO DE OURO

4.1.1 TRANSMITÂNCIA DO FILME

A medida do filme de ouro foi realizada utilizando um espectrofotômetro seguindo a metodologia descrita no item 3.3.2. Os testes foram realizados nas faixas de comprimento de onda do visível (Vis), ultravioleta (UV) e infravermelho próximo (NIR). Os resultados estão apresentados nos gráficos da Figura 29.

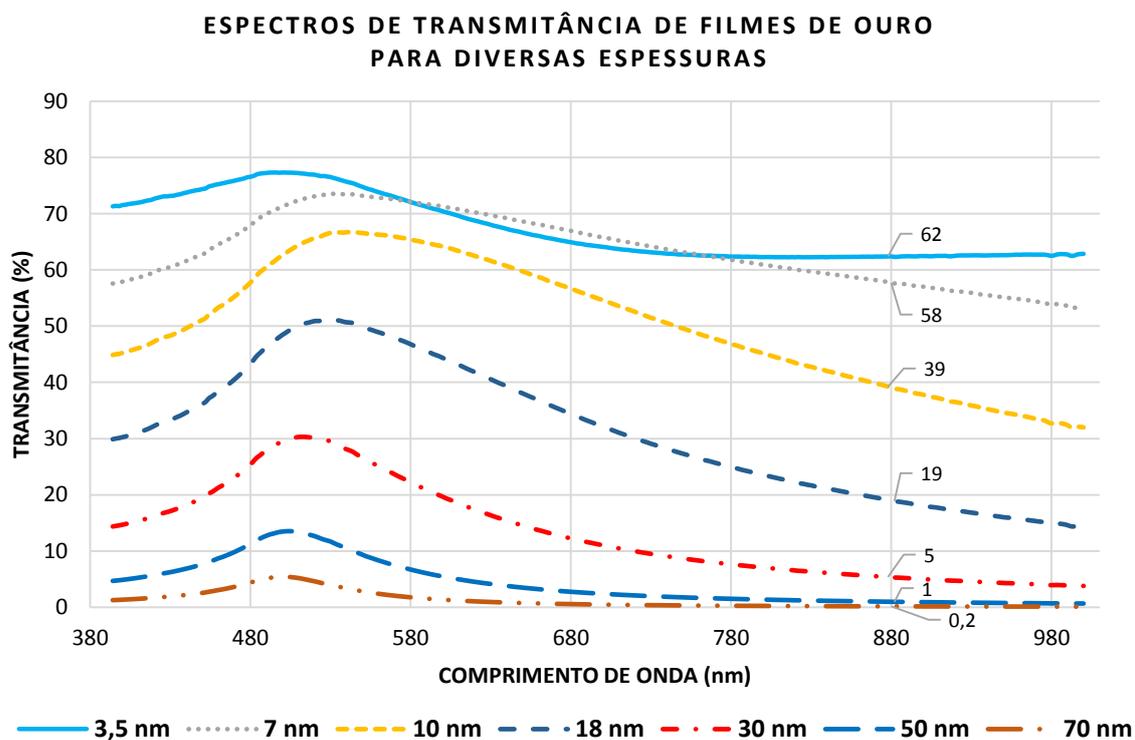


Figura 29 – Espectro de transmitância dos filmes de ouro nas faixas do comprimento de onda do visível (Vis) e ultravioleta (UV) obtidas por espectrofotometria. Os valores de transmitância de cada espessura de filme para o comprimento de onda do LED (880 nm) estão indicados no gráfico.

Os resultados dos testes de transmitância dos filmes de ouro mostram que, para o comprimento de onda do LED de 880 nm utilizado pelo *setup* 1, os filmes com espessura acima de 30 nm possuem transparência menor que 1 % e os filmes com espessura menor que 18 nm têm transparência maior que 19 %. Ou seja, um sensor revestido com um filme de ouro de espessura maior que 30 nm não vai perder muita luz na curva uma vez que a

transmitância é muito baixa e praticamente a totalidade da luz vai ser refletida de volta para o interior da fibra.

Para todas as espessuras do filme de ouro testadas, a transmitância é maior para comprimentos de onda entre 450 e 550 nm. Portanto, o uso de um LED com comprimento de onda nessa faixa, nos sensores que funcionam pelo efeito da perda de luz na curva, vai permitir uma maior perda de luz para o meio, e com isso, um aumento de sensibilidade, desde que se use um fotodiodo com maior ganho nessa faixa.

Esses resultados encontrados para os filmes de ouro em diferentes espessuras foram condizentes com os encontrados por AXELEVITCH *et al.* (2013). Os filmes apresentaram um máximo próximo de 500 nm, que é inerente ao filme de ouro, correspondente à natureza do metal. O filme de 3,5 nm foi o único que apresentou um ponto de mínimo no espectro de transmitância (Figura 29), e possivelmente está associado à uma estrutura descontínua da película (AXELEVITCH *et al.*, 2013).

4.1.2 TAXA DE DEPOSIÇÃO E ESPESSURA DO FILME

A taxa de deposição do *sputtering* foi obtida seguindo a metodologia descrita no item 3.3.1. Duas técnicas foram empregadas: perfilometria, para medir os filmes com espessura maior que 50 nm; e transmitância para os filmes mais finos, menores que 50 nm. Os resultados estão apresentados na Figura 30.

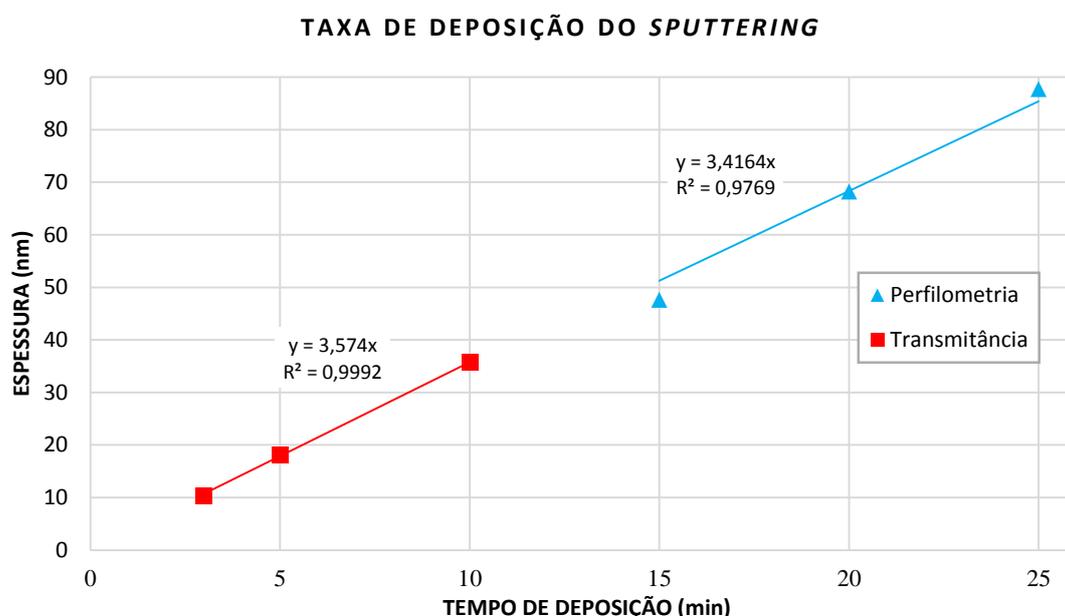


Figura 30 – Espessura do filme de ouro em função do tempo de deposição pelo *sputtering* obtida por dois métodos. A taxa de deposição é obtida pela derivada dessas funções.

Os resultados mostram que a técnica de deposição por *sputtering* apresenta uma relação linear entre a espessura do filme e o tempo de deposição, o que está de acordo com os trabalhos de ALI (1999), CAMACHO *et al.* (2014), FILIPOVIC e SELBERHERR (2015), LANSAKER *et al.* (2013).

A taxa de deposição é obtida pela derivada dessas equações. A técnica do perfilômetro e a de transmitância apresentaram taxas de deposição próximas, 3,57 e 3,41 nm/min respectivamente, uma diferença menor do que 5 %. A taxa de deposição considerada foi de 3,5 nm/min, média dos resultados das duas técnicas.

Filme fino de ouro foi depositado em lâminas de vidro por diferentes períodos de tempo, apresentando diferentes cores. A cor azul claro predominou nos filmes de 3,5 nm e acima desta espessura uma coloração de dourada transparente a dourado espelhado à medida que a espessura foi aumentando, o que está de acordo com CAO *et al.* (2014) e CAMARA *et al.* (2013). Os filmes produzidos são apresentados na Figura 31.

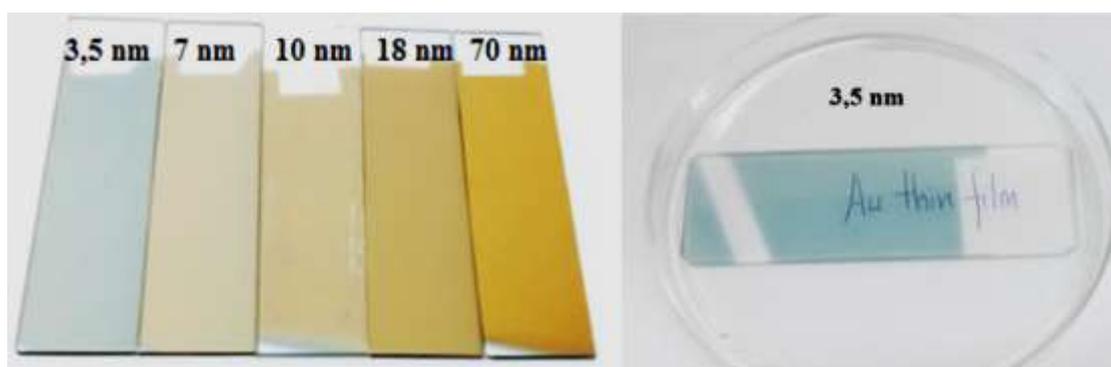


Figura 31 – Fotos das lâminas de vidro com diversas espessuras de filmes de ouro depositados no *sputtering* para determinação da taxa de deposição.

4.2 RESULTADOS DOS TESTES DAS MEDIDAS DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

4.2.1 ENSAIOS COM SACAROSE NO *SETUP* 1

Inicialmente, os sensores foram testados com soluções aquosas de sacarose para verificar sua capacidade de medir o índice de refração dentro da faixa esperada de operação. Com esses resultados, foi possível levantar a curva de calibração e a regressão inversa, verificar a linearidade da resposta, a sensibilidade e a influência do filme fino de ouro no comportamento do sensor, além de determinar o desvio padrão e a incerteza das medidas. Foram testados pelo menos cinco sensores para cada espessura de ouro, assim como para o sensor sem revestimento de ouro.

As curvas médias de calibração ou valores normalizados dos sensores para cada espessura de filme de ouro são vistas na Figura 32.

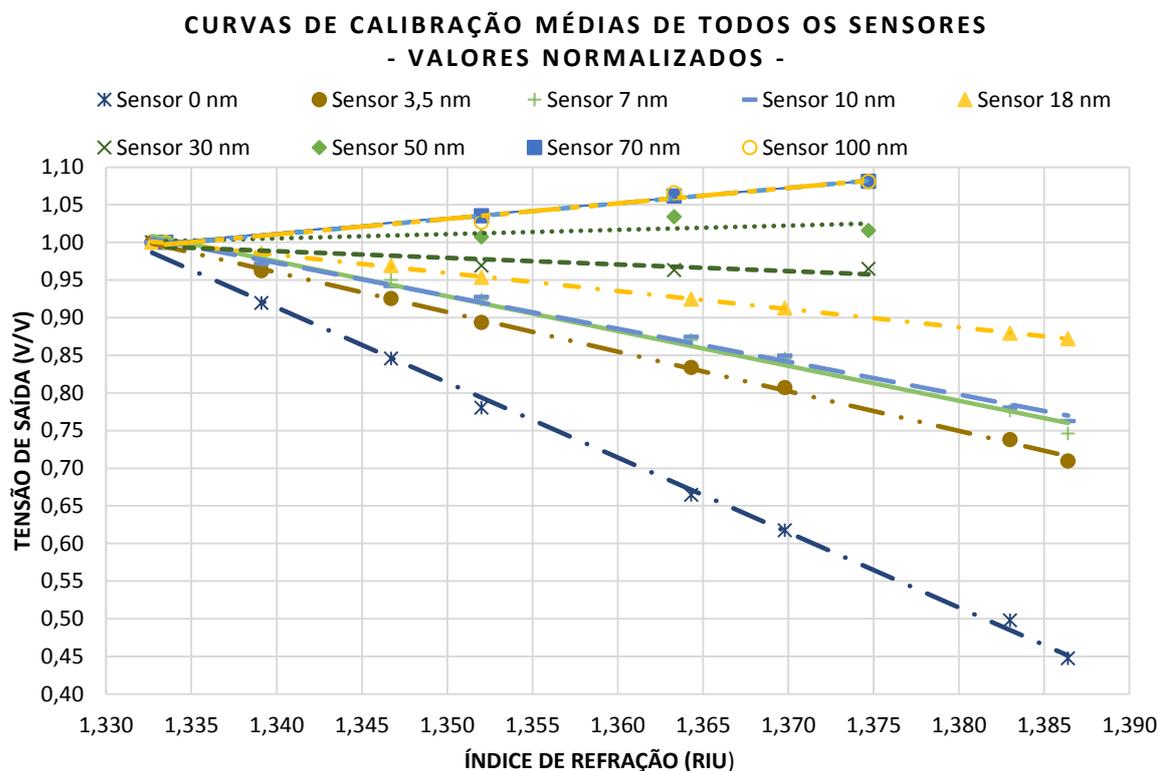


Figura 32 –Curvas de calibração médias dos sensores – valores normalizados.

Todas as curvas foram obtidas por meio da regressão linear das médias dos pontos experimentais. Os coeficientes de determinação R^2 de todas as retas são maiores que 0,97, confirmando que os ajustes por equações lineares estão adequados.

A Tabela 5 mostra os valores de sensibilidade, desvio padrão e incerteza expandida máxima para cada espessura.

Tabela 5 – Sensibilidade e incerteza expandida medindo o índice de refração de soluções de sacarose com o *setup* 1

Espessura do filme de ouro (nm)	Sensibilidade Média (V/RIU)	Maior incerteza expandida (95 %) da regressão inversa (RIU)
0	-39,71	$3,5 \times 10^{-3}$
3,5	-20,34	$2,9 \times 10^{-3}$
7	-16,73	$7,4 \times 10^{-3}$
10	-17,57	$9,8 \times 10^{-3}$
18	-9,53	$5,5 \times 10^{-3}$
70	6,01	$1,9 \times 10^{-2}$
100	8,25	$7,7 \times 10^{-2}$

O sensor em “U” sem revestimento de ouro apresentou um comportamento linear para toda a faixa de 1,33 a 1,39 e uma sensibilidade de -39,71 V/RIU.

Os filmes com espessuras de até 18 nm apresentaram um comportamento linear para toda a faixa de 1,33 a 1,39, equivalente ao sensor sem filme que funciona pelo princípio da perda de luz na curva. Esses filmes reduziram a sensibilidade do sensor. Os resultados dos ensaios dos sensores com 30 e 50 nm de espessura de ouro apresentaram um comportamento não-linear e muito pouco sensível à variação do índice de refração. Ou seja, não representam opções viáveis para essa aplicação, portanto, não foram realizados estudos estatísticos mais aprofundados para estes sensores. Já os sensores com 70 e 100 nm de ouro apresentaram um comportamento linear para uma faixa de 1,33 a 1,38, que é uma faixa útil para detecção da bactéria, porém diretamente proporcional ao índice de refração assim como os resultados apresentados por KURIHARA *et al.* (2002) e RNOT-TRIOLI *et al.* (1996). Um resumo com as sensibilidades de todos os sensores é apresentado na Figura 33.

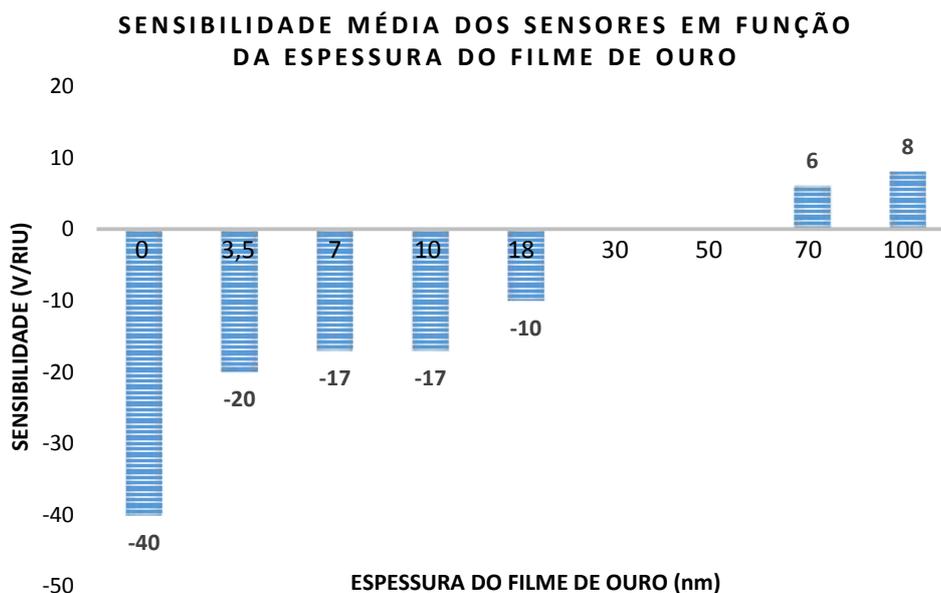


Figura 33 – Sensibilidade média (arredondada) dos sensores em função da espessura da camada de ouro. Os sensores com 30 nm e 50 nm não apresentaram uma resposta linear e, portanto, não foram considerados.

4.2.2 ENSAIOS COM SACAROSE NO *SETUP* 2

Neste item são apresentados os resultados da medida do índice de refração dos sensores com o *setup* 2, que fornece um espectro de transmitância como resposta. Foram realizados testes com soluções de sacarose do sensor sem revestimento e do sensor com 10 nm e 70 nm. O de 10 nm, que funciona pelo princípio da perda de luz na curva, foi escolhido por não ter comprometido muito a sensibilidade como foi o caso de 18 nm.

Além disso apresentou melhor adesão do filme à fibra possuindo maior resistência aos reagentes empregados na imobilização que o filmes mais finos. O sensor de 70 nm, que funciona pelo princípio de SPR, foi escolhido por apresentar uma resposta suficientemente linear e empregar menor quantidade de ouro, comparado ao filme de 100 nm.

Outra vantagem deste *setup* é permitir a escolha do comprimento de onda que apresenta maior sensibilidade. A Figura 34 apresenta as curvas de calibração do sensor para três comprimentos de onda: 600 nm, 800 nm e 845 nm. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear e as equações correspondentes são mostrados na Figura 34.

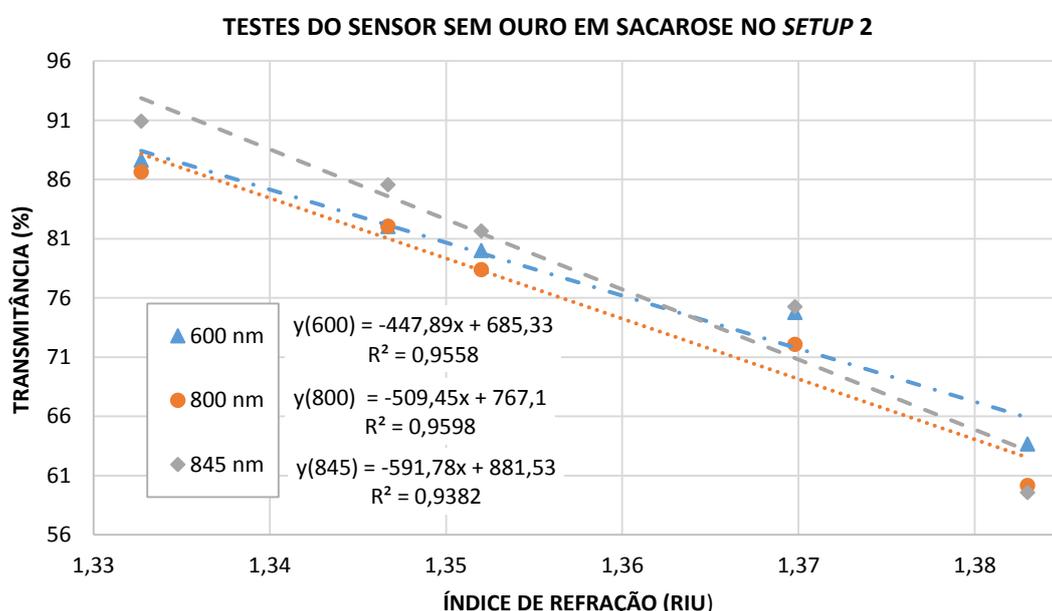


Figura 34 – Curvas de calibração do sensor em “U” sem ouro para os comprimentos de onda de 600 nm, 800 nm e 845 nm com o *setup* 2.

Como esperado para um sensor sem filme que funciona pelo efeito da perda de luz na curva, a intensidade de luz transmitida diminuiu com o aumento do índice de refração do meio, conforme explicado no item 2.1.2.

O resultado do sensor com 10 nm é visto na Figura 35 para dois comprimentos de onda: 600 nm e 800 nm. O sensor com 10 nm apresentou um comportamento esperado com queda na intensidade da luz transmitida em função do aumento do índice de refração do meio, assim como o sensor em “U” sem revestimento de ouro, contudo, com uma sensibilidade menor. Diferentemente do resultado do *setup* 1, em que o filme de 10 nm reduziu a sensibilidade pela metade, a redução no *setup* 2 foi maior, de 3 a 4 vezes.

Os resultados do sensor com 70 nm são vistos na Figura 36 para três comprimentos de onda: 600, 800 e 845 nm. O sensor com 70 nm apresentou um comportamento esperado com aumento da intensidade da luz transmitida em função do aumento do índice de refração do meio, assim como apresentado no *setup* 1.

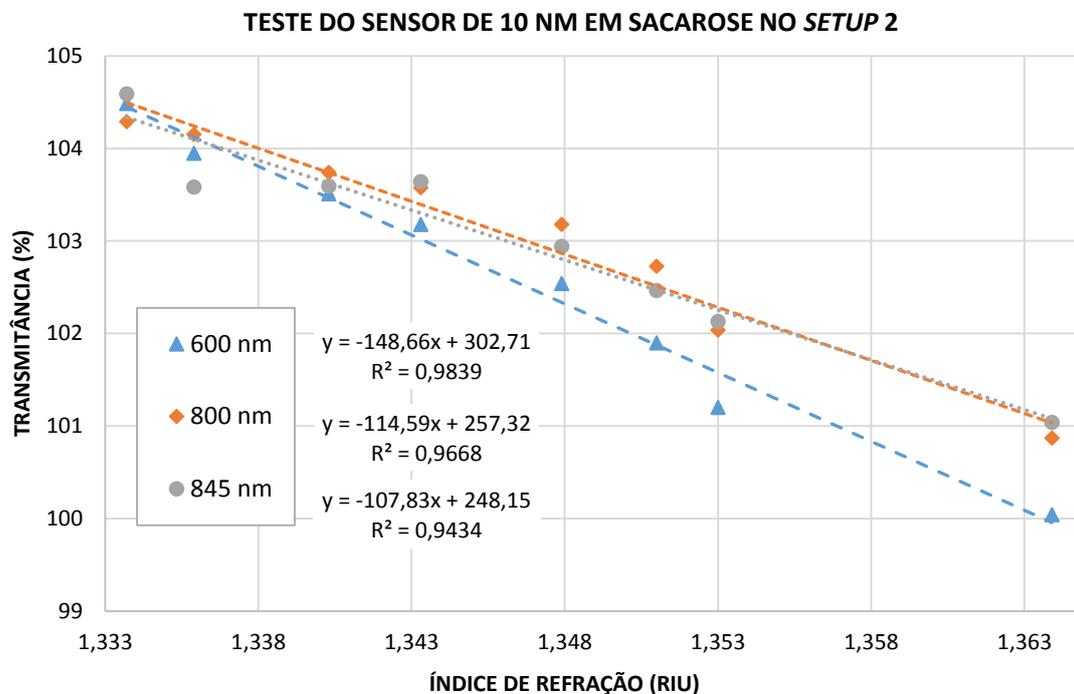


Figura 35 – Curva de calibração de um sensor em “U” com 10 nm de ouro para o comprimento de onda de 600 e 800 nm com o *setup* 2.

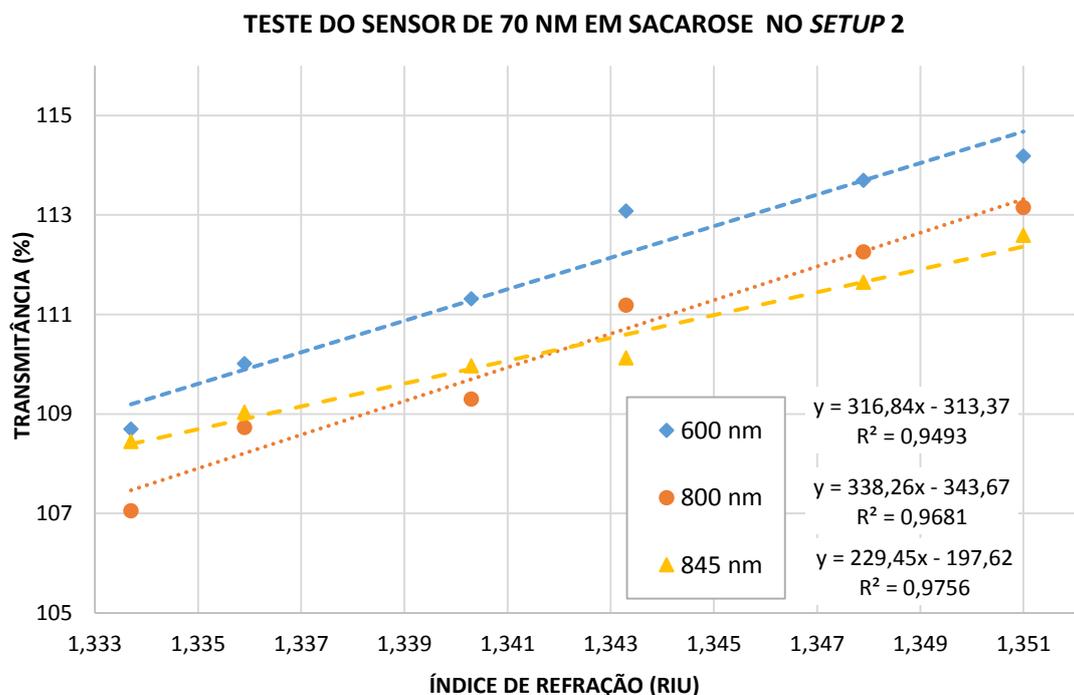


Figura 36 – Curvas de calibração do sensor em “U” com 70 nm de ouro com agitação de 60 rpm para os comprimentos de onda de 600, 800 e 845 nm com o *setup* 2.

A Tabela 6 mostra um resumo dos resultados dos sensores com o *setup 2* na sacarose.

Tabela 6 – Sensibilidade e incerteza medindo índice de refração em soluções de sacarose com o *setup 2*.

Espessura do filme de ouro (nm)	Sensibilidade Máxima ($\Delta T/RIU$)	Maior incerteza expandida (95 %) (RIU)
0	-591,78 (845 nm)	5×10^{-4}
10	-148,66 (600 nm)	
70	338,26 (800 nm)	

Como o sensor de 70 nm apresentou maior sensibilidade em relação ao sensor de 10 nm, ele foi escolhido para os testes com bactérias no *setup 2*.

4.3 RESULTADOS DOS TESTES COM BACTÉRIAS

4.3.1 ENSAIOS COM BACTÉRIAS NO *SETUP 1*

Este item apresenta os principais resultados encontrados durante os testes com bactérias usando o *setup 1* e aplicando o protocolo II de imobilização em sensores com 10 e 70 nm de filme fino de ouro. Foram escolhidos dois sensores: o de 10 nm que funciona pelo princípio de perda de luz na curva e o de 70 nm que funciona por SPR. Dentre os sensores que funcionam pelo princípio de perda de luz na curva, o sensor de 10 nm teve sensibilidade maior que o de 18 nm e apresentou melhor adesão e maior resistência aos reagentes do que os de 3,5 nm e 7 nm, o que foi constatado durante os testes. Dentre os sensores que funcionam por SPR, o de 70 nm foi escolhido por apresentar uma resposta linear dentro da faixa de interesse e por empregar menor quantidade de ouro que o de 100 nm.

O Protocolo I de imobilização apresentou baixa imunocaptura de bactérias (visualizadas em microscópio óptico), logo, outro protocolo foi desenvolvido, testado e apresentou maior distribuição das bactérias sobre o sensor. A partir de então, todos os testes utilizaram o Protocolo II.

Os resultados dos testes do sensor de 10 nm imobilizado com o Potocolo II com uma concentração de bactérias de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL são vistos na Figura 37.

O sensor de referência, representado pela linha azul, é um sensor com filme fino de ouro de 10 nm que não foi imobilizado o que lhe confere a percepção do índice de refração do meio, mas sem a capacidade de capturar as bactérias e, portanto, não pode sofrer variações em função do tempo. Sua função é confirmar a eficiência da imobilização.

Observando os gráficos da Figura 37, percebe-se que o sensor imobilizado teve sua tensão de saída reduzida em função do tempo, o que não aconteceu com o sensor de referência, comprovando que a imunocaptura das bactérias com o tempo vai aumentando o índice de refração da região próxima ao sensor.

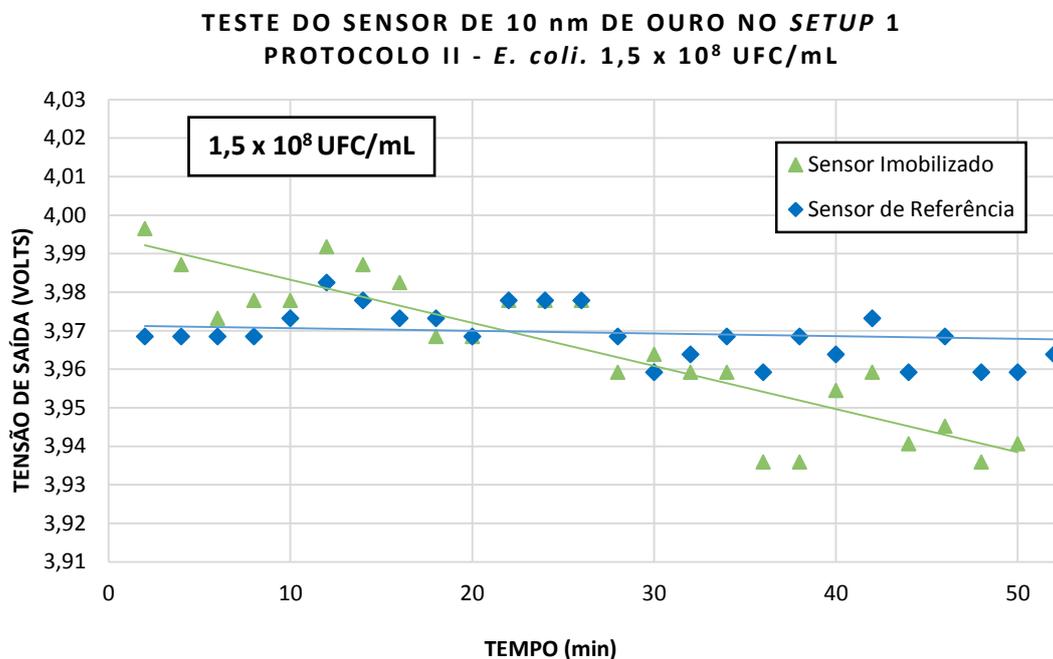


Figura 37 – Resultados da resposta do sensor de referência e de um sensor em “U” revestido com 10 nm de ouro imobilizado com o Protocolo II medindo uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *E. coli* com o *setup* 1.

Os resultados dos testes do sensor de 70 nm imobilizado com o protocolo II com uma concentração de bactérias de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL são vistos na Figura 38.

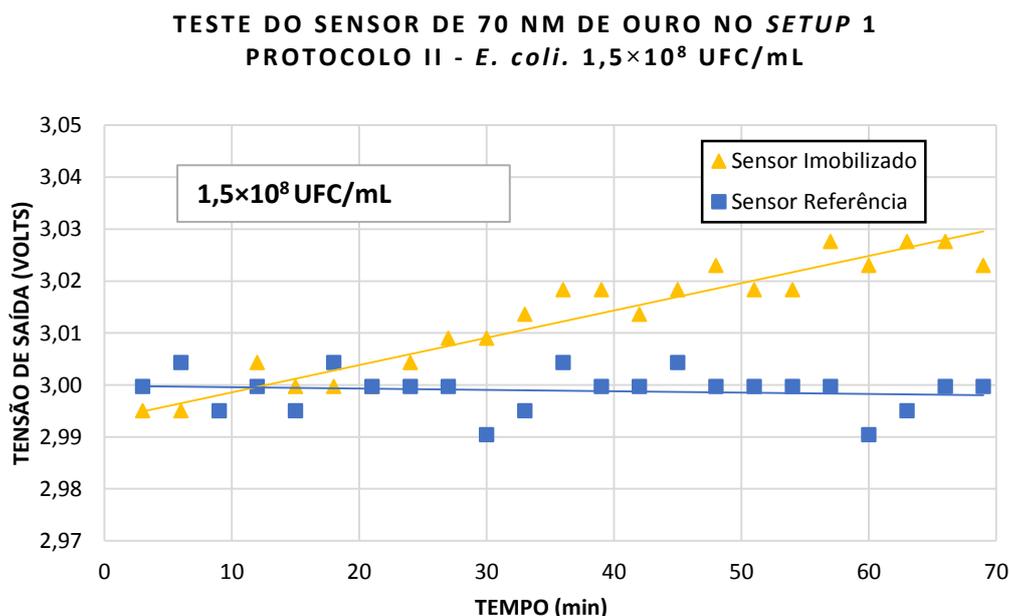


Figura 38 – Resultados dos testes do sensor em “U” revestido com 70 nm de ouro e imobilizado com o Protocolo II medindo uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *E. coli* com o *setup* 1.

Observando a Figura 38, percebe-se que o sensor de 70 nm imobilizado teve um aumento da tensão de saída em função do tempo, o que não aconteceu com o sensor de referência, comprovando que a imunocaptura gradativa das bactérias vai aumentando o índice de refração da região próxima ao sensor.

O *setup* 1 se mostrou incapaz de medir concentrações menores que $1,5 \times 10^6$ UFC/mL de bactérias, Figura 39.

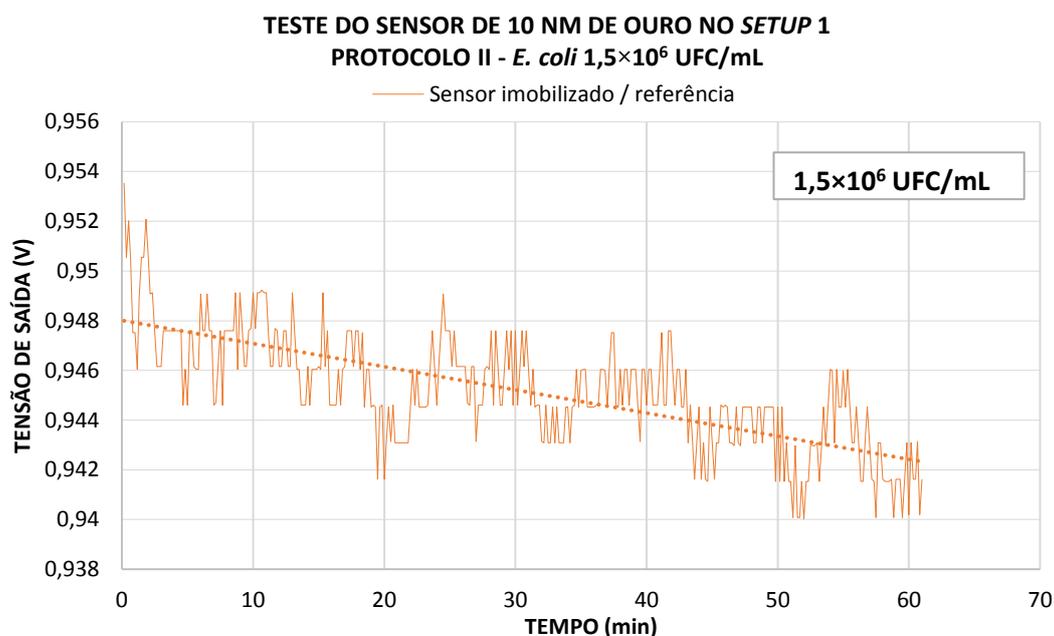


Figura 39 – Resultados dos testes do sensor em “U” revestido com 10 nm de ouro e imobilizado com o Protocolo II medindo uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL de *E. coli* com o *setup* 1.

A fim de medir concentrações menores, decidiu-se utilizar um espectrômetro, que apresentou melhor sensibilidade.

4.3.2 ENSAIOS COM BACTÉRIAS NO *SETUP* 2

Sensores de 70 nm foram submetidos a ensaios com soluções de bactérias. Foi escolhido o filme de 70 nm por ter apresentado maior sensibilidade que o filme de 10 nm, nos testes com sacarose com o *setup* 2. Os resultados dos testes do sensor de 70 nm imobilizado com o Protocolo II com uma concentração de bactérias de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL são vistos na Figura 40.

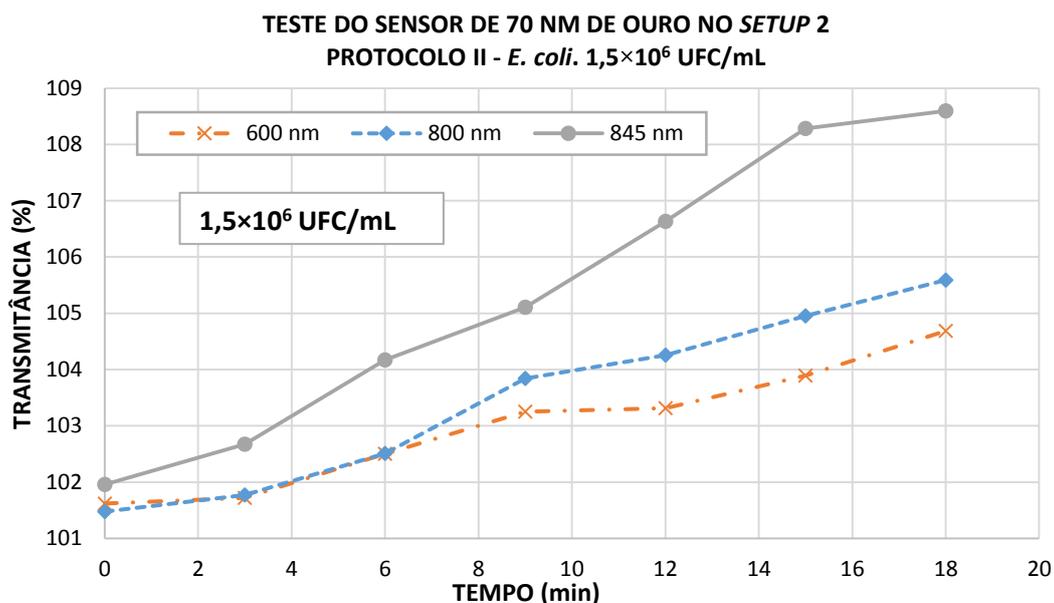


Figura 40 – Resultados dos testes do sensor em “U” revestido com 70 nm de ouro e imobilizado com o Protocolo II medindo uma concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL de *E. coli* com o *setup 2*.

Observando os gráficos da Figura 40, percebe-se que o sensor de 70 nm apresentou um aumento da tensão de saída em função do tempo comprovando a imunocaptura das bactérias. A taxa de variação é diferente para comprimentos de onda diferentes, já que, conforme demonstrado nos testes com sacarose, a sensibilidade do sensor depende do comprimento de onda.

Os resultados dos testes do sensor de 70 nm imobilizado com o Protocolo II com uma concentração de bactérias de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL são vistos na Figura 41.

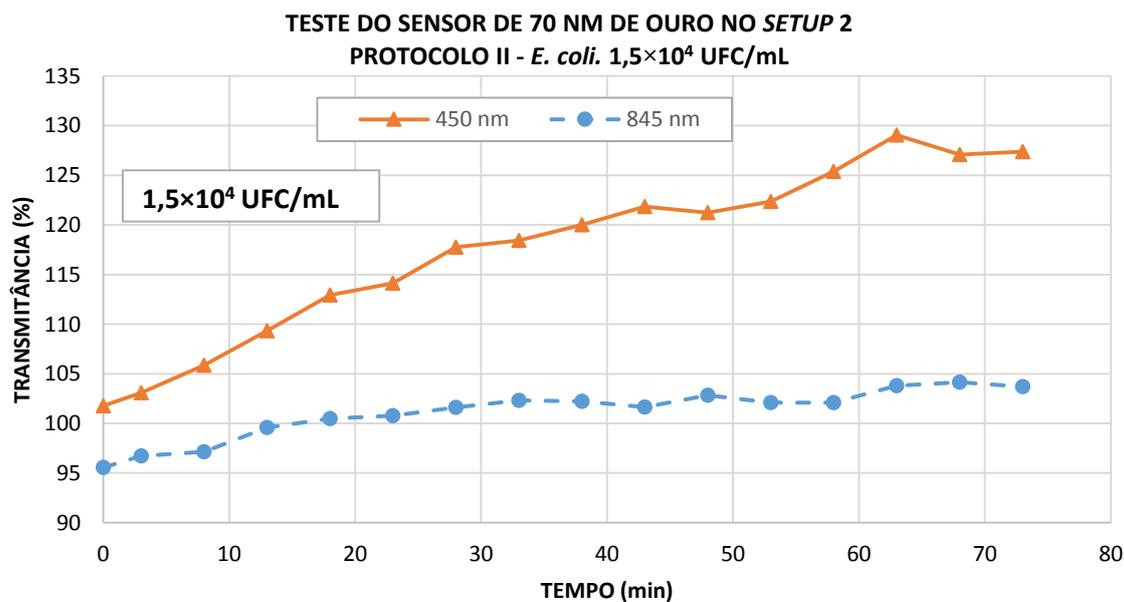


Figura 41 – Resultado do sensor imobilizado com 70 nm de ouro com agitação de 60 rpm e testado em suspensão de *E. coli* a $1,5 \times 10^4$ UFC/mL na do *setup 2*.

Observando os gráficos da Figura 41, percebe-se que o sensor de 70 nm apresentou um aumento da tensão de saída em função do tempo comprovando a imunocaptura das bactérias.

Os resultados dos testes do sensor de 70 nm imobilizado com o Protocolo II com uma concentração de bactérias de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL são vistos na Figura 42.

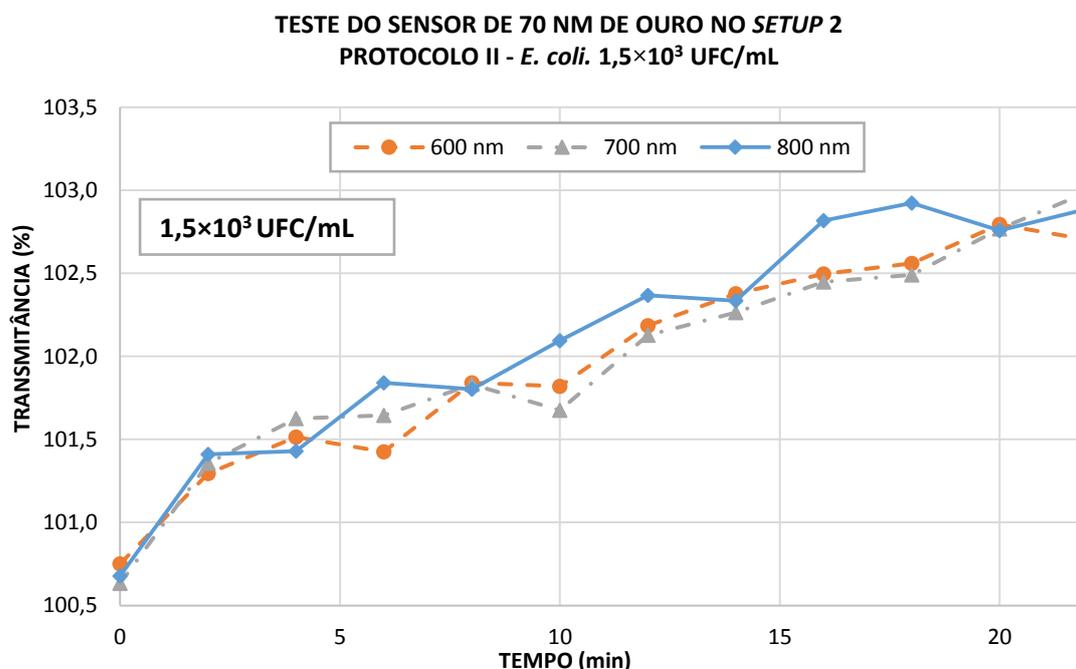


Figura 42 – Resposta do sensor imobilizado com 70 nm com agitação de 60 rpm e testado em suspensão de *E. coli* a $1,5 \times 10^3$ UFC/mL nos comprimentos de onda de 700 nm.

Observando os gráficos da Figura 42, percebe-se que o sensor de 70 nm foi capaz de medir concentrações de *E. coli* $1,5 \times 10^3$ UFC/mL.

4.4 TESTES DE SELETIVIDADE PARA A BACTÉRIA *E. COLI*

Os sensores foram imobilizados com anticorpos policlonais. Optou-se por não utilizar os anticorpos monoclonais, que são muito seletivos, pelo custo elevado.

O próprio fabricante dos anticorpos policlonais utilizados informa que eles podem capturar outras bactérias da mesma espécie da *E. coli*. Portanto, a fim de verificar a capacidade seletiva dos sensores foram realizados testes com as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* e *Bacillus subtilis*. Uma bactéria do tipo Gram-positivo e duas Gram-negativas, respectivamente. Os resultados dos testes realizados tanto com o *setup* 1 quanto com o *setup* 2 estão apresentados nas Figuras 43, 44 e 45.

Na Figura 43, três sensores imobilizados com anticorpo da bactéria *E. coli* foram testados com suspensões da bactéria *Enterobacter cloacae* com uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Os gráficos mostram os resultados de cada sensor imobilizado dividido pela resposta do sensor de referência. Observa-se que, nos três casos, para um período de tempo maior que 40 min, os sensores não apresentaram nenhuma tendência comprovando que o anticorpo usado não captura este tipo de bactéria, nem mesmo em alta concentração.

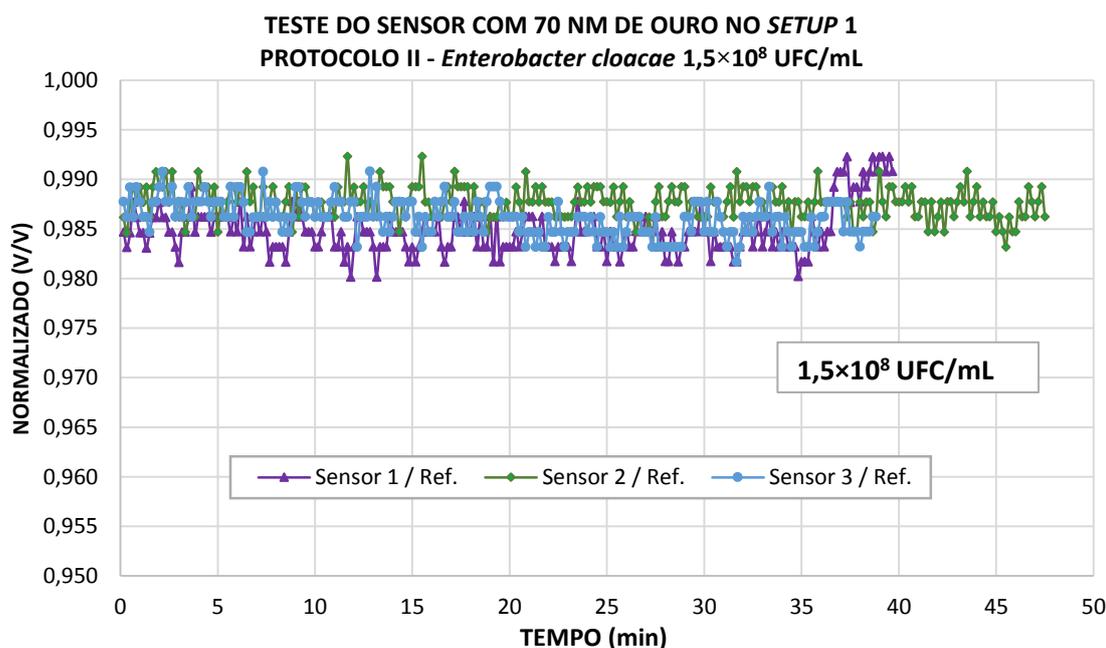


Figura 43 – Sensores de 70 nm imobilizados com anticorpos de *E. coli* pelo protocolo II, testados no *setup* 1 e mergulhados em suspensão de *Enterobacter cloacae* $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Cada gráfico é o resultado da leitura do sensor imobilizado dividido pelo sensor de referência.

Na Figura 44, o sensor de 70 nm imobilizado com anticorpo da bactéria *E. coli* foi testado em suspensões da bactéria *Salmonella typhimurium* com uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Os gráficos mostram os resultados para dois comprimentos de onda diferentes, 600 e 845 nm. Observa-se que, neste caso, o sensor detectou a presença de uma bactéria diferente da *E. coli*, o que é indesejável, mesmo para uma alta concentração.

Na Figura 45, o sensor de 70 nm imobilizado com anticorpo da bactéria *E. coli* foi testado com soluções da bactéria *Bacillus subtilis* com uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Os gráficos mostram os resultados para dois comprimentos de onda diferentes, 600 e 800 nm. Observa-se que, neste caso, o sensor não apresentou nenhuma tendência comprovando que os anticorpos não capturam este tipo de bactéria, nem mesmo em alta concentração.

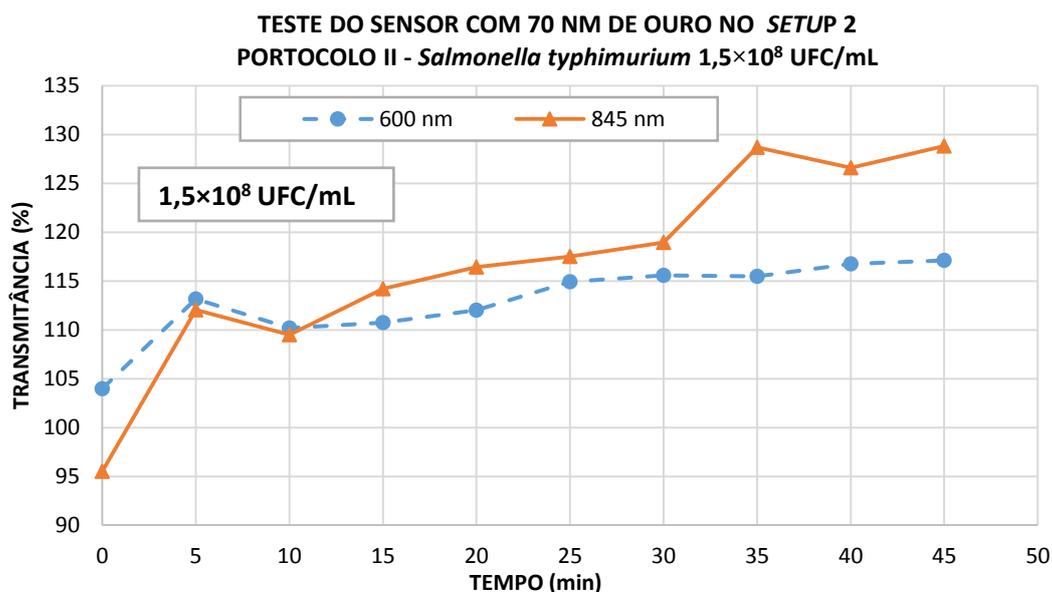


Figura 44 – Sensor de 70 nm imobilizado com anticorpos de *E. coli* pelo protocolo II, testado no *setup 2* e mergulhado em suspensão de *Salmonella typhimurium* 1,5×10⁸ UFC/mL.

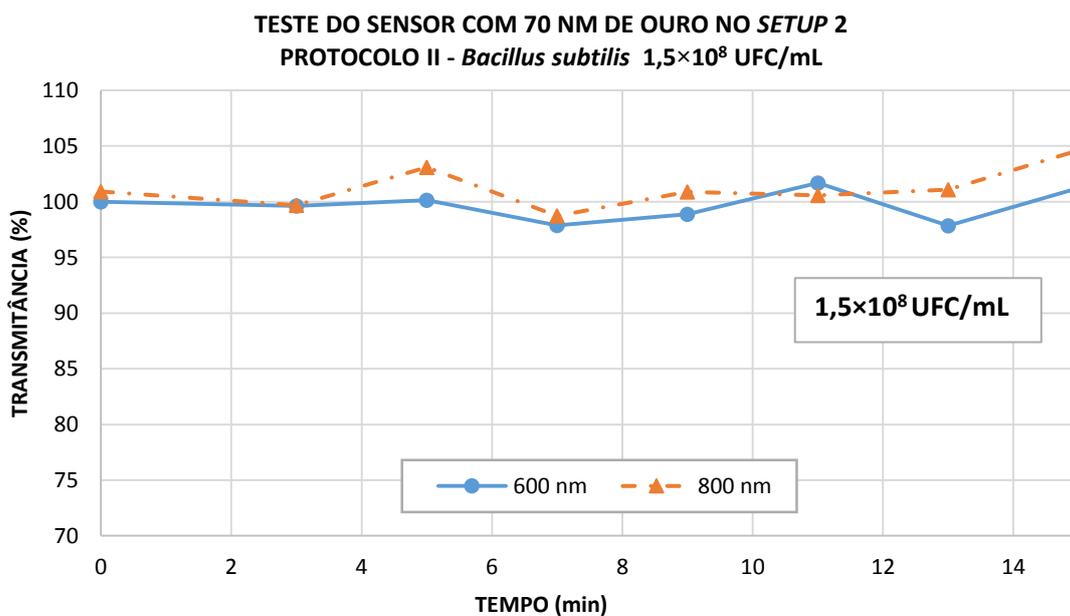


Figura 45 – Sensor de 70 nm imobilizado com anticorpos de *E. coli* pelo protocolo II e mergulhado em suspensão de *Bacillus subtilis* 1,5×10⁸ UFC/mL.

4.5 ÁREA DE COBERTURA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

A estimativa da área de cobertura dos sensores pelas bactérias foi obtida através da metodologia descrita no item 3.8.1.

A Figura 46 mostra os resultados obtidos por Microscopia Óptica da adesão das bactérias sobre a superfície do sensor imobilizado com o Protocolo I após imersão em suspensão com concentração de 1,5×10⁸ UFC/mL de *E. coli*. O percentual de cobertura das bactérias sobre a superfície foi estimado através do *software* ImageJ.

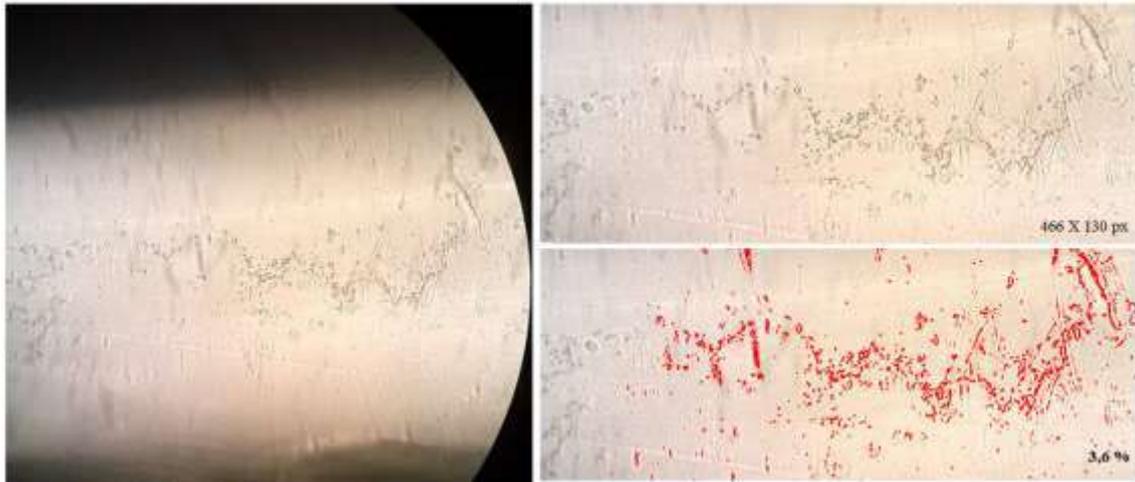


Figura 46 – Resultado da adesão das bactérias *E. coli* em um filme de 70 nm sobre a superfície do sensor usando o Protocolo I após imersão em uma suspensão com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A área de cobertura estimada pelo ImageJ foi de 3,6 %. As imagens foram produzidas em Microscópio Óptico e ampliada 40 vezes.

O Protocolo I apresentou baixa adesão das bactérias *E. coli* sobre a superfície do sensor o que foi decisivo para a substituição do Protocolo I pelo II.

O Protocolo II foi testado inicialmente sobre uma lâmina de vidro contendo um filme fino de ouro de 70 nm imobilizado com anticorpos da bactéria. As imagens obtidas por Microscopia Óptica da adesão das bactérias sobre a superfície da lâmina de vidro imobilizada com o Protocolo II após imersão em suspensão com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *E. coli* são vistas na Figura 47.

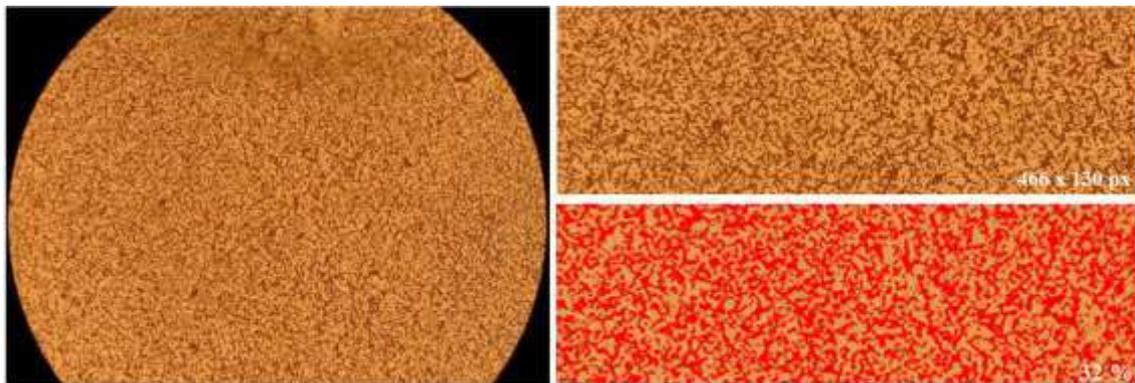


Figura 47 – Imagem de microscópio óptico (com imersão da amostra e ampliada em 100 vezes) da adesão das bactérias *E. coli* em um filme de 70 nm sobre a superfície de uma lâmina imobilizada com o Protocolo II após imersão em suspensão com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A estimativa da área de cobertura foi de 32 %.

O Protocolo II proporcionou uma melhora na adesão das bactérias com uma cobertura de adesão estimada em 32 %. Em testes com os sensores também foi possível constatar esta melhora, conforme pode ser visto na Figura 48.

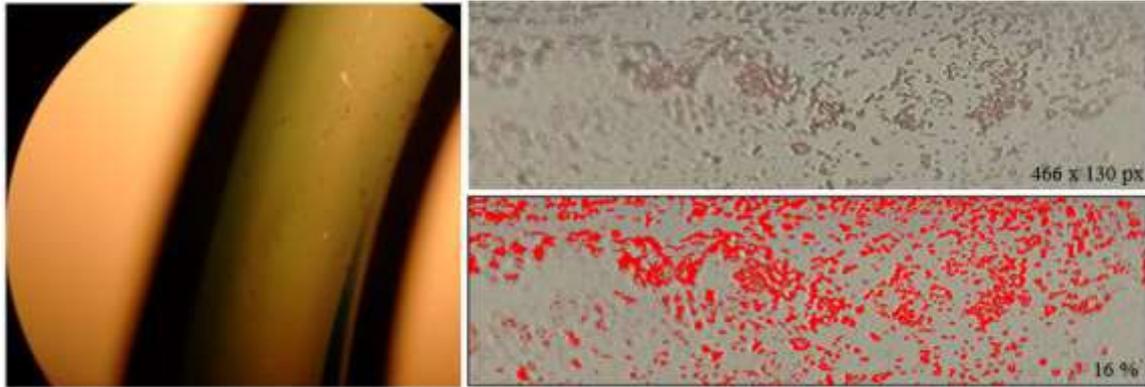


Figura 48 – Resultado da adesão das bactérias *E. coli* em um filme de 70 nm sobre a superfície do sensor usando o Protocolo II após imersão em uma suspensão com concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A área de cobertura estimada pelo ImageJ foi de 16 %. As imagens foram produzidas em Microscópio Óptico e ampliada 40x.

Na Figura 48 observa-se uma maior cobertura de bactérias sobre a fibra nas mesmas condições de testes para o protocolo I. Uma estimativa da área de cobertura calculada pelo *software* ImageJ para o Protocolo I foi de 3,6 %, enquanto que para o Protocolo II foi de 16 %, ou seja, 4,5 vezes maior.

4.6 MICROGRAFIAS DA BACTÉRIA SOBRE O SENSOR

Por possuir dimensão micrométrica, a visualização da bactéria aderida à superfície do sensor é possível somente por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Mas antes, para a conservação das amostras biológicas dentro da câmara de vácuo foi necessária a desidratação das bactérias através da técnica de secagem por Ponto Crítico, conforme descrito no item 3.8.2. As imagens obtidas são vistas na Figura 49.

Na Figura 49 observa-se que as bactérias não estão tão aglomeradas conforme se esperava. Isso ocorreu porque o processo de tratamento por Ponto Crítico danificou a superfície da fibra removendo o ouro e conseqüentemente, as bactérias, como mostra a Figura 49.d.

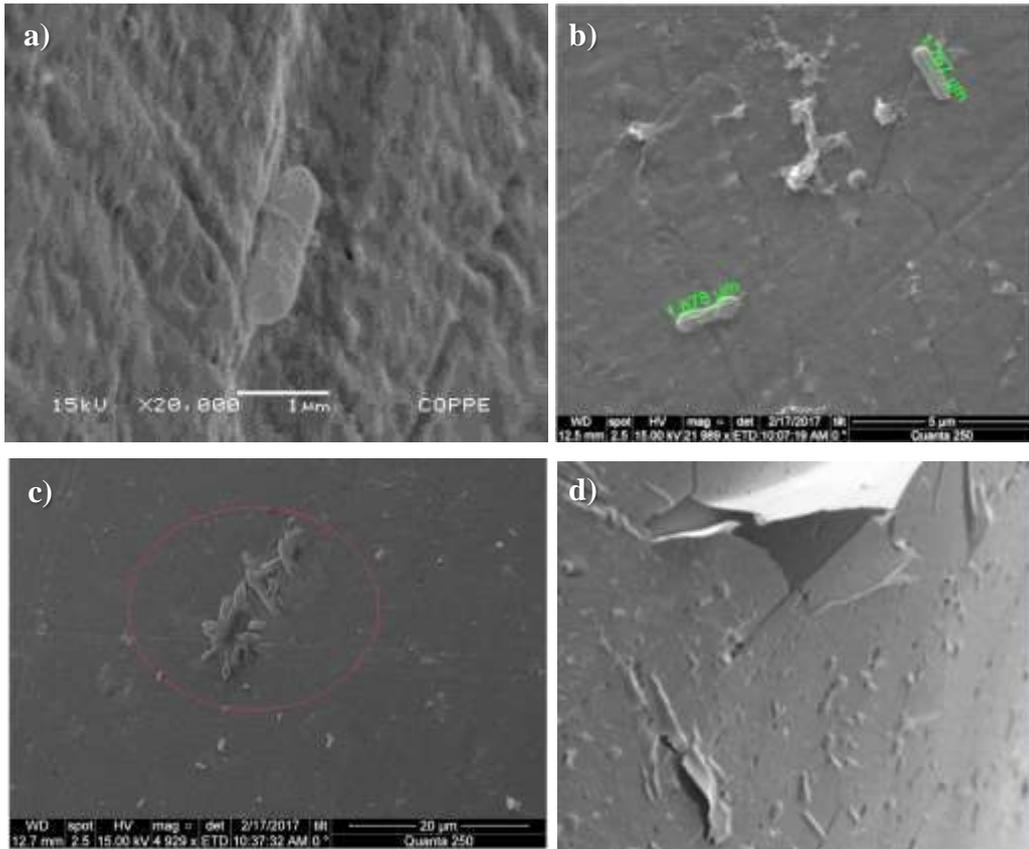


Figura 49 – Micrografias da bactéria *Escherichia coli* sobre a superfície do sensor em “U” com 70 nm em MEV. a) *E. coli* vista pelo MEV do PEMM/UFRJ ampliada em 20.000 vezes. b) Medidas do comprimento da bactéria no MEV do CENABIO. c) Bactérias aglomeradas sobre a superfície do sensor. Imagens produzidas no MEV do CENABIO. d) Filme fino de ouro sobre a superfície do sensor destruído após o procedimento de Ponto Crítico.

5 CONCLUSÕES

A proposta deste trabalho foi desenvolver um nanobiossensor a fibra óptica revestido com filme fino de ouro para detecção da bactéria *Escherichia coli* por modulação de intensidade da luz como uma solução de resposta rápida, portátil e de baixo custo. A fibra óptica plástica foi escolhida por seu baixo custo e pela facilidade de manuseio. Optou-se pelo sensor em forma de “U” para permitir o efeito da perda de luz na curva e SPR sem a necessidade de remoção da casca. A modulação de intensidade da luz foi escolhida por ser a técnica de instrumentação de menor custo de implementação. E de acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que:

- Os filmes com espessuras de até 18 nm apresentaram um comportamento linear para toda a faixa de 1,33 a 1,39, equivalente ao sensor sem filme, porém, eles reduziram a sensibilidade do sensor uma vez que formam uma camada translúcida impedindo a refração de boa parte da luz para o meio externo;
- Os filmes com espessuras acima de 70 nm apresentaram um comportamento linear em uma faixa mais estreita, de 1,33 a 1,38, e uma resposta diretamente proporcional ao índice de refração;
- Os filmes com espessuras de 30 e 50 nm apresentaram um comportamento não linear para a faixa de interesse e pouco sensível à variação do índice de refração, portanto, não são configurações úteis para esse tipo de aplicação.
- O protocolo de imobilização II é 4,5 vezes mais eficiente que o protocolo I, o que sugere que as concentrações dos reagentes EDAC e NHS são fatores preponderantes no processo de imobilização.
- O *setup* 1 não apresentou sensibilidade suficiente para medir concentrações menores que $1,5 \times 10^6$ UFC/mL de bactérias;
- O *setup* 2 com o sensor de 70 nm foi capaz de medir uma concentração de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL de bactérias.
- Testes de seletividade demonstraram que o sensor não captura a bactéria *Bacillus Subtilis* (Gram-Positivas). Contudo, detectou a presença da *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter cloacae* (Gram-Negativa) devido ao uso de anticorpos policlonais.

5.1 TRABALHOS FUTUROS

A fim de dar continuidade a este trabalho e aperfeiçoar a tecnologia, sugere-se adotar as seguintes ações:

- Desenvolver um *setup* portátil, mais sensível, com suporte para dois sensores, com um LED de comprimento de onda mais adequado;
- Testar anticorpos monoclonais nos protocolos de imobilização;
- Com objetivo de aumentar ainda mais a área de cobertura, novos protocolos de imobilização podem ser testados.
- Estudar a possibilidade de correlacionar a taxa de variação da tensão de saída com a concentração de bactéria para uma detecção mais rápida.

6 REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D. L., MELO, A. M. A., BORGES, M. de F., FIGUEIREDO, E. A. T., ALVES, C. R., FURTADO, R. F. “Desenvolvimento de biossensor eletroquímico a partir de eletrodo descartável de ouro para a detecção de *Salmonella* sp.”, *Revista Brasileira de Biodiversidade e Biotecnologia*, ISSN: 2447–6714, Teresina, Piauí-PI, Brasil, 2015.

ALI, Mannan. 1999. Growth and study of magnetostrictive FeSiBC thin films for device applications. Tese, University of Sheffield, Reino Unido.

ALVES, A. R. de F., 2012. “Doenças Alimentares de Origem Bacteriana”. Dissertação, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

AMANI, J., AHAMADPOUR, A., FOOLADI, A. A. I., NAZARIAN, S., 2015. “Detection of *E. coli* O157: H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR-ELISA”, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.19, n.3, pp. 278–84.

ANDERSON, G. P., JACOB, M. A., LIGLER S., KING, K. D., 1997. “Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor”, *Biosensors & Bioelectronics*, v.12, n.4, pp. 329–36.

ANÔNIMO, 2014. “Graded Index fiber”. Disponível em: <<http://physics.stackexchange.com/questions/106477/graded-index-fiber>>. Acesso em 09 mar. 2017.

ANVISA. Resolução RDC No 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o "Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos", *ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, pp.1-37. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 2 dez. 2015.

ANVISA, Resolução RDC Nº 54, de 15 de junho de 2000. "Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral Natural e Água Natural", *ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, pp.1-7. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 4 de jan. de 2017.

ARAÚJO, G., “Anticorpos e Antígenos. Disponível em: <http://pt-br.aia1317.wikia.com/wiki/Anticorpos_e_Ant%C3%ADgenos_I>. Acesso em 31.jan.2017.

ASSIS, D. M., JULIANO, L., JULIANO, M. A., 2011. “A espectrometria de massa aplicada na classificação e indentificação de microorganismos”, *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 9, n.2, pp. 344–55.

AXELEVITCH, A., APTER, B., GOLAN, G., 2013. “Simulation and experimental investigation of optical transparency in gold island films”, *Optics express*, v.21, n.4, pp. 4126–38.

DARYANY, M.K.A., MASSUDI, R., HOSSEINI, M., 2008. “Photoinactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* suspended in phosphate-buffered saline-A using 266- and 355-nm pulsed ultraviolet light”, *Current Microbiology*, v. 56, n.5, pp. 423–28.

BACCAR, H., MEJRI, M. B., HAFIYEDH, I., KTARI, T., AOUNI, M., ABDELGHANI, A., 2010, “Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection”, *Talanta*, v.82, n.2, pp. 810–14.

BAL-TEC, 1997. “CPD 030 Critical Point Dryer and coating rate measuring device”, Manual de operação, pp. 1–64. Disponível em: <<http://www.baltic-paerparation.de/broschuerencpd030.html?file=files/Baltic/Broschueren/Brochure%20CPD%20030.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2016.

BAL-TEC, 1999. "CPD 030 Critical Point Dryer". Disponível em: <https://static1.squarespace.com/static/57b26cc76b8f5b7524bf9ed2/t/58097ce09f7456c1aec2f527/1477016801097/BalTec_CPd.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2016.

- BALAEV, A. E., DVORETSKI, K. N., DOUBROVSKI, V. A., 2002. "Refractive index of *Escherichia coli* cells", *Proceedings of SPIE (Saratov Fall Meeting 2001: Optical Technologies in Biophysics and Medicine III)*, v.4707, pp.253–60.
- BARRETO, J. R., 2015, Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas", Tese, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, SP, Brasil.
- BARRY, J., SPILLMAN, W. B., 2002. "Nanosensors: Physical, Chemical, and Biological", *Taylor & Francis*, Organizado por KHANNA, V. K., pp.603-10, 2016.
- BEDINO, James H., 2003. "Embalming Chemistry: Glutaraldehyde versus Formaldehyde", *Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices*, n.649, pp. 2614–32.
- BENFATO, M. S. Lei de Lambert. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/conceito.o.html>. Acesso em: 13 nov. 2016
- BERES, C., NAZARÉ, F.V.B., SOUZA, C.C., MIGUEL, M.A.L., WERNECK, M., 2011. "Tapered Plastic Optical Fiber-Based Biosensor - Tests and Application", *Biosensors and Bioelectronics*, v.30, n.1, pp.328–32.
- BEVERSLUIS, M., BOUHELIER, A., NOVOTNY, L., 2003. "Continuum generation from single gold nanostructures through near-field mediated intraband transitions", *Physical Review B*, v.68, n.11, pp.1–10.
- BOLTOVETS, P.M., SNOPOK, B.A., BOYKO, V.R., SHEVCHENKO, T.P., DYACHENKO, N.S., SHIRSHOV, Y. M., 2004. "Detection of plant viruses using a surface plasmon resonance via complexing with specific antibodies". *Journal of Virological Methods*, v.121, n.1, p.101–106.
- BOTTERO, M. T., DALMASSO, A., SOGLIA, D., ROSATI, S., DECASTELLI, L., CIVERA, 2004. "Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products", *Molecular and Cellular Probes*, v.18, n.4, pp.283–88.
- BRYANT, F.D., SEIBER, B., LATIMER, P., 1969. "Absolute optical cross sections of cells and chloroplasts". *Archives of biochemistry and biophysics*, v.135, n.1, pp.97–108.
- CABRAL-MIRANDA, G., YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H. G., GIDLUND, M., SALES, M. G. F., 2014. "Specific label-free and real-time detection of oxidized low density lipoprotein (oxLDL) using an immunosensor with three monoclonal antibodies", *Journal of Materials Chemistry B*, v.2, n.5, pp. 477–84.
- CAMACHO-ESPINOSA, E., ROSENDO, E., DÍAZ, T., 2014. "Effects of temperature and deposition time on the RF- Sputtered CdTe films preparation", *Superficies y Vacío*, v. 27, n.1, pp. 15–19.
- CAMARA, A. R., 2015. "Biossensor e Dispositivo Eletro-óptico em Fibras Ópticas Especiais". Tese, PUC-Rio, Rio de Janeiro - RJ, Brasil. Disponível em: <http://www.dbd.puc-rio.br/pergamum/teses/abertas/1112917_2015_completo.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2015
- CAMARA, A. R., GOUVÊA, P.M, DIAS, A.C., BRAGA, A.M., DUTRA, R.F., DE ARAÚJO, R.E, CARVALHO, I.C, 2013. "Dengue immunoassay with an LSPR fiber optic sensor", *Optics express* v. 21, n. 22, pp. 27023–31.
- CAO, J., SUN, T., GRATAN, K.T.V, 2014. "Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, n.195, pp. 332–51.
- CDC, 2016. "*Escherichia coli* (*E. coli*)", Centers for Disease Control and Prevention 2. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/pdfs/cdc-e.-coli-factsheet.pdf>>. Acesso em: 1 mai. 2016.

- CELIKOL-AYDIN, S., SUO, Z., YANG, X., INCE, B., AVCI, R., 2014. "Sharp Transition in the Immunoimmobilization of *E. coli* O157:H7", *Langmuir*, v.30, n.26, pp.7755–7761.
- CENNAMO, N., VARRIALE, A., PENNACCHIO, A., STAIANO, M., MASSAROTTIC, D., ZENIA, L., D'AURIA, S., 2013. "An innovative plastic optical fiber-based biosensor for new bio/applications the case of celiac disease", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, n.176, pp. 1008–14.
- CHRISTOPHER, C., SUBRAHMANYAM, A., SAI, V.V.R., 2017. Gold sputtered U-bent plastic optical fiber probes as SPR and LSPR based compact plasmonic sensors. *Plasmonics*, pp.1–20.
- CIPRIAN, D., HLUBINA, P., 2013. "Theoretical model of the influence of oxide overlayer thickness on the performance of a surface plasmon fibre-optic sensor". *Measurement Science and Technology*, v.24, n.2, pp.25105.
- CONAMA. Resolução No 274 de 29 de novembro de 2000, "Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras", *Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA*, pp.3–5.
- DALLAGASSA, C. B., 2012. "Caracterização de estirpes de *Aeromonas spp.* *Escherichia coli* através de espectrometria de massa MALDI-TOF". Dissertação, Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.
- DICKEL, E. L., RODRIGUES, L. B., SANTOS, L. R., VALLE, S. F., PILOTTO, F., RODEMBUSH, C., WALD, V. B., CANAL, C. W., NASCIMENTO, V. P., 2005. "ELISA e PCR para detecção de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum* e *S. pullorum* em carne de frango contaminada artificialmente", *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, n.12, pp.5–10.
- DUARTE, D. P., ALBERTO, N. J., BILRO, L. "Theoretical modeling of an U-shaped SPR fiber sensor in 1550-nm spectral range for sensing applications". Second International Conference on Applications of Optics and Photonics, v.9286, Aveiro, Portugal, 22 maio 2014.
- EISENSTEIN, J., WONG, P. Y., CAO, C. G. L., 2010. "Evaluation of techniques to model bend loss in multimode fibers for endoscopic application", *Applied optics* v. 49, n.12, pp.2220–31.
- EKGASIT, S., YU, F., KNOLL, W., 2005. "Fluorescence intensity in surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v.104, n.2, pp.294–301.
- ELLISON, S L R, ROSSLEIN, M, e WILLIAMS, A., 2002. "Guia EURACHEM / CITAC Determinando a Incerteza na Medição Analítica". *Sociedade Brasileira de Metrologia Serviço Nacional de Aprendizagem*, 2º edição, pp.110.
- SB, 2004. "ELISA Principle Basis and Extension". Disponível em: <<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-Principle>>. Acesso em: 07 de fev. 2017.
- ESMERINO, L. A., PEREIRA, A. V. P., ADAMOWICZ, T. B. D. M., TALACIOMON, E. A., SCHELESKY, M. E., 2004. "A Microbiological Assay for Determining the Potency of Antimicrobials". *Publ. UEPG, Ciência Biológicas e da Saúde*, v.10, n.1, pp.53–60.
- ESTRELA, C., 1997. "Eficácia Antimicrobiana de Pastas de Hidróxido de Cálcio", Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-FORP-USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil.
- FABIAN, M., LEWIS, E., NEWE, T., LOCHMANN, S., MULLER, I., 2008. "Investigation of Ethanol And Methanol Water Mixtures in the Visible Wavelength Area Using Fibre-Optic Evanescent Field Absorption Sensors Based on a U-Shaped, a Coil-Shaped and a Meander-Shaped Probe", *IEEE Sensors Applications Symposium*. pp.1–6.

- FERNANDES, L. F. C., 2009. "Seção: Tutoriais Redes Ópticas: Fibra Óptica III: Fibra Monomodo." *Inteligência em telecomunicações (TELECO)*. Disponível em: <http://www.teleco.com.br/tutoriais/tutorialfoIII/pagina_5.asp>. Acesso em: 7 fev. 2017.
- FILIPOVIC, L., SELBERHERR, S., 2015. "Performance and Stress Analysis of Metal Oxide Films for CMOS-Integrated Gas Sensors", *Sensors*, v.15, n.4, pp.7206–27.
- FILMETRIC, Inc. 2016. Disponível em: <<http://www.filmetrics.com/pdf/Filmetrics%5CnTutorial%5Cn-%5CnThickness%5CnMetrology%5CnGuide%5Cnv3N.pdf>>. Acesso em 15 nov. 2016.
- FILMETRICS F20, 2012. "Operations Manual for the FILMETRICS F20 Thin-FilmAnalyzer". Manual, Revisão 6.9.2. Disponível em: <<http://www.che.ufl.edu/unit-ops-lab/experiments/SC/F20-manual.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
- FIXE, F., DUFVA, M., TELLEMAN, P., CHRISTENSEN, C. B. V., 2004. "Functionalization of poly(methylmethacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays", *Nucleic Acids Research*, v.32, n.1, pp.1–8.
- FU, J., PARK, B., ZHAO, Y., 2009. "Limitation of a localized surface plasmon resonance sensor for *Salmonella* detection", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v.141, n.1, pp. 276–83.
- FUKUSHIMA, H., KAWASE, J., ETOH, Y., SUGAMA, K., YASHIRO, S., IIDA, N., YAMAGUCHI, K., 2010, "Simultaneous screening of 24 target genes of foodborne pathogens in 35 foodborne outbreaks using multiplex real-time SYBR green PCR analysis", *International Journal of Microbiology*, v.2010, pp.1-18.
- FUNG, D. Y. C., 2000. "Rapid methods and automation in microbiology: A review", *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, v.39, n. 2, pp.301–7.
- GARIBYAN, L., AVACHI, N., 2013. "Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)", *Institutes Health of National*, v.18, n.4, pp.20382.
- GENG, T., UKNALIS, J., TU, S., BHUNIA, A. K., 2006. "Fiber-Optic Biosensor Employing Alexa-Fluor Conjugated Antibody for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef in Four Hours", *Sensors*, v.6, n.8, pp.796–807.
- GORDON, B., CALLAN, P., VICKERS, C., 2008. "WHO guidelines for drinking-water quality." *WHO chronicle*, v.38, n.3, pp. 564. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf>. Acesso em: 20 set. 2016.
- GOWRI, A., SAI, V. V. R., 2016. "Development of LSPR based U-bent plastic optical fiber sensors", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, n.230, pp.536–43.
- GROSS, E., PIRES, M., FERNANDER, V., 2014. "Curso teórico prático de técnicas em microscopia eletrônica", Universidade Estadual de Santa Cruz, pp.1-18, Ilhéus, Bahia-BA. Disponível em: <http://www.uesc.br/centros/cme/arquivos/apostila_curso_cme.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2016.
- HALKARE, P., PUNJABI, N., WANGCHUK, J., KONDABAGIL, K., MUKHERJI, S. "LSPR based fiber optic sensor for detection of *E. coli* using bacteriophage T4, Workshop on Recent Advances in Photonics (WRAP), Bangalore, 2015, pp. 1-4.
- HAVELAAR, A.H., BRUL, S., DE JONG, A., DE JONGE, R., ZWIETERING, M.H, TER K. B.H., 2010. "Future challenges to microbial food safety", *International Journal of Food Microbiology*, v.139, n.2010, pp. S79–S94.
- HOCK, B., SEIFERT, M., KRAMER, K., 2002. "Engineering receptors and antibodies for biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, v.17, n.3, pp. 239–49.

- HOMOLA, J., YEE, S.S., e GAUGLITZ, G., 1999. "Surface plasmon resonance sensors: review". *Sensors and Actuators B: Chemical*, V.54, pp.3–15.
- HOWSTUFFWORK, 2001. "The *E. coli* bacterium", Science Howstuffworks. Disponível em: <<http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/cell1.htm>>. Acesso em 13 dez. 2016.
- HSIEH, B., CHANG, Y., NG, M., LIU, W., LIN, C., WU, H., CHOU, C., 2007. "Localized Surface Plasmon Coupled Fluorescence Fiber-Optic Biosensor with Gold Nanoparticles", *Analytical Chemistry*, v.79, n.9, pp.3487–93.
- ISO GUM, 2008. "Avaliação de dados de Medição - Guia para a expressão de incerteza de medição", 1ª edição brasileira, Rio de Janeiro, RJ, pp.141, 2012.
- JONES, B., SPILLMAN, W.B. "Nanosensors: Physical, Chemical, and Biological", *Taylor & F. V. K. Khanna*, 2002, pp.603.
- KAMINO, J., 2000. "A FIBRA ÓPTICA EM APLICAÇÕES". FURUKAWA. Disponível em: <http://portal.furukawa.com.br/arquivos/i/inf/informativo/2185_fibrasempresariaisOFS.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2017.
- KASHI, A.M., TAHERMANESH, K., CHAICHIAN, S., JOGHATAEI, M.T., MORADI, F., TAVANGAR, S. M., NAJAFABADI, A.S.M., LOTFIBAKHSHAIESH, N., BEYRANVAND, S.P., ANVARI-YAZDI, A.F., ABEL, S.M., 2014. "How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM)", *Galen Medical Journal*, v.3, n.2, pp.63–80.
- KHÉCHINE, A. E., COUDERC, C., FLAUDROPS, C., RAOULT, D., DRANCOURT M., 2011. "Matrix-Assisted laser desorption/ionization Time-Of-Flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice", *PLoS One*, v.6, n.9, pp. e24720.
- KHIJWANIA, S. K., GUPTA, B. D., 2000. "Maximum achievable sensitivity of the fiber optic evanescent field absorption sensor based on the U-shaped probe", *Optics Communications*, v.175, n.1, pp.135–37.
- KHIJWANIA, S. K., SRINIVASAN, K.L., SINGH, J.P., 2005. "An evanescent-wave optical fiber relative humidity sensor with enhanced sensitivity", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v.104, n.2, pp.217–22.
- KIM, H., KANG D.Y., GOH H.J., OH, B.K., SINGH, R.P, OH, S.M., CHOI, J.W., 2008. "Analysis of direct immobilized recombinant protein G on a gold surface". *Ultramicroscopy*, v.108, n.10, pp.1152–1156.
- KIM, S. M., KIM, S. H., PARK, E. J., CHO, D. L., LEE, M. S. "Gold Coating of a Plastic Optical Fiber Based on", v. 5612, Series Lecture Notes in Computer Science, 13th International Conference, HCI International, San Diego, CA, USA, 2009, pp. 760–67.
- KIM, S., LU, L., CHUNG, J. H., LEE, K., LI, Y., JUN, S., 2011. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.12, n.4, pp. 617–622.
- KOOYMAN, R. P. H. SCHASFOORT, R. B. M., TUDOS, A. J., "Physics of Surface Plasmon Resonance, Handbook of Surface Plasmon Resonance, Eds.; Royal Society of Chemistry, 2008, pp. 15-34.
- KOOSY, A., MERK, V., SIMAKOV, D., LEOSSON, K., KÉNA-COHEN, S., MAIER, S.A., 2015. "Optical and Structural Properties of Ultra-thin Gold Films", *Advanced Optical Materials*, v.3, n.1, pp.71–77.
- KRETZER, J.W, BIEBL, M., MILLER, S. Sample preparation—an essential prerequisite for high-quality bacteria detection, Springer New York, EUA, 2008, pp.15-30.

- KURIHARA, K., NAKAMURA, K., SUZUKI, K., 2002. "Asymmetric SPR sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of SPR resonance angle", *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v.86, n.1, pp.49–57.
- LAL, S., LINK, S., HALAS, N. J., 2007. "Nano-optics from sensing to waveguiding". *Nature Photonics*, v.1, n.11, pp.641–48.
- LANSAKER, P. C., PETERSSON, P., NIKLASSON, G. A., GRANQVIST, C. G., 2013. "Thin sputter deposited gold films on In₂O₃: Sn, SnO₂:In, TiO₂ and glass: Optical, electrical and structural effects", *Solar Energy Materials and Solar Cells*, v.117, pp.462–70.
- LAZCKA, O., CAMPO, F.J. D., MUÑOZ, F.X., 2007. "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, n.7, pp.1205–17.
- LI, D., SONGLIN, Y., CHANGWEI, S., CHONGWEI, Z., HAIXIA, Y., KEXIN, X., 2015. "U-shaped fiber-optic ATR sensor enhanced by silver nanoparticles for continuous glucose monitoring." *Biosensors & bioelectronics*, v.72, pp.370–75.
- Li, Y., AFRASIABI, R., FATHI, F., WANG, N., XIANG, C., LOVE, R., SHE, Z., KRAATZ, H. B., 2014. "Impedance based detection of pathogenic *E. coli* O157:H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, v.58, pp.193–99.
- LIM, J. Y., YOON, J. W., HOVDE, C. J., 2013. "A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157", v.20, n.1, pp.5–14.
- LIN, C. J., JENSEN, K. L., YEN, S. T. "Determinants Of Consumer Awareness Of Foodborne Pathogens". American Agricultural Economics, Association Annual Meeting, Denver, Colorado, August 1–4, 2004.
- LIU, Y., LIU, Q., CHEN, S., CHENG, F., WANG, H., PENG, W., 2015. "Surface Plasmon Resonance Biosensor Based on Smart Phone Platforms," *Scientific reports* v.5, pp.12864.
- LOCKING, M. E., BRIEN, S. J. O., REILLY, W. J., WRIGHT, E. M., CAMPBELL, D. M., COIA, J. E., BROWNING, L. M., RAMSAY, C. N., 2001. "Risk factors for sporadic cases of *Escherichia coli* O157 infection: the importance of contact with animal excreta," *Epidemiology and infection*, v.127, n.2, pp.215–20.
- LOEBICH, O., 1972. "The optical properties of gold", *Gold Bulletin*, v.5, pp.2–10. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF03215148>>. Acesso em: 13 nov. 2015.
- LORETO COLLEGE. "BY4: Methods of measuring bacterial growth". Disponível em: <<http://loretocollegebiology.weebly.com/measuring-bacterial-growth.html>>. Acesso em: 6 de fev. 2017.
- LOVE, W., BUTTON, L., SLOVACEK, R. "Optical characteristics of fiber optic evanescent wave sensors", D.L. Wise, L.B. Wingard (Ed), *Biosensors with Fiberoptics*, Humana Press, Totowa, NJ, 1991, pp. 139-180.
- LU, L., JUN, S., 2012. "Evaluation of a microwire sensor functionalized to detect *Escherichia coli* bacterial cells," *Biosensors and Bioelectronics*, v.36, n.1, pp.257–61.
- MACÊDO, N.R., MENEZES, C.P.L., LAGEL, A.P., RISTOW, L.E., REIS, A., GUEDES, R.M.C., 2007. "Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos". *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.5, pp.1117–23.
- MALOU, N., RAOULT, D., 2011. "Immuno-PCR: A promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies," *Trends in Microbiology*, v.19, n.6, pp.295–302.
- MANTELE, W., DENIZ, E., 2017. "UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded", *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.173, pp.965–968.

- MCFARLAND, 2010. “Padrão de Turvação preparado BBL.” Disponível em: < <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=20546>. Acesso em: 6 nov. 2015.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG L.F., BRESSE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M, TAUXE, R.V., 1999. “Food-related illness and death in the United States,” *Emerging Infectious Diseases*, v.5, n.5, pp.607–25.
- MENDES, A., ROSÁRIO, P. P. “Metrologia & Incerteza de Medição”, EPSE, São Paulo-SP, pp.130, agosto, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 2010. "Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2015.
- MIRANDA, G. C., 2014. “Novos biossensores baseados em anticorpos naturais e sintéticos para detecção de LDL oxidada (oxLDL) usada como biomarcador de Novos biossensores baseados em anticorpos naturais e sintéticos para detecção de LDL oxidada (oxLDL) usada como biomarcador”. Tese, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.
- MITTELSTAEDT, S., CARVALHO, V. M., 2006. “Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 – revisão”, *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*, v.24, n.3, pp.175–82.
- MOTOKANE, M., VALLE, M., 2005. “Teia Do Do Saber”, *Biologia Molecular e as Relações CTS*. Disponível em: <[http://sites.ffclrp.usp.br/laife/teia/Arquivos/Apostilas/12-29-10-05/TurmaI/Apostila Biologia Molecular.pdf](http://sites.ffclrp.usp.br/laife/teia/Arquivos/Apostilas/12-29-10-05/TurmaI/Apostila%20Biologia%20Molecular.pdf)>. Acesso em: 24. jan. 2017
- MOURA, C. C., SEGUNDO, M. A., NEVES, J., REIS, S., SARMENTO, 2014. “Co-Association of Methotrexate and SPIONs into Anti-CD64 Antibody-Conjugated PLGA Nanoparticles for Theranostic Application,” *International Journal of Nanomedicine*, v.9, n.1, pp. 4911–22.
- MULTICOM. Single Mode vs. Multi-Mode Fiber Optic Cable. Disponível em: <<http://www.multicominc.com/training/technical-resources/single-mode-vs-multi-mode-fiber-optic-cable/>>. Acesso em 4 jan. 2017.
- MUHAMMAD-TAHIR, Z., ALOCILJA, E. C., 2003. “A conductometric biosensor for biosecurity”, *Biosensors and Bioelectronics*, v.18, n.2003, pp.813–19.
- NEVES, R. B. S., 2011. Nanotecnologia aplicado à indústria de Alimentos: o uso de biossensores. Universidade Federal de Goiás (UFG), Escola de veterinária e zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia-GO, Brasil.
- NIMSE, S. B., SONG, K., SONAWANE, M. D., SAYYED, D. R., KIM, T., 2014. “Immobilization techniques for microarray: challenges and applications”, *Sensors (Basel, Switzerland)*, v.14, n.12, pp.22208–29.
- NSW Food Authority, 2009. “Microbiological quality guide for ready to-eat foods. A guide to interpreting microbiological results”, *NSW/FA/CP028/0906*, n.(Jul), pp.1-9. Disponível em: <[http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/scienceandtechnical/microbiological_quality_guidefor RTE_food.pdf](http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/scienceandtechnical/microbiological_quality_guidefor_RTE_food.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2016.
- OBANDO, L. L., BOOKSH, K. S., 1999. “Tuning dynamic range and sensitivity of white-light, multimode, fiber-optic surface plasmon resonance sensors”, *Analytical Chemistry*, v.71, n.22, pp.5116–22.
- OIE, 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, v.1, *Office International Des Epizooties*, 6º ed., pp.110-117, 2008.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z., 2007. Desenvolvimento de biossensores e sensores biométricos para determinação de compostos fenólicos. Tese, Programa de Pós-Graduação do Departamento de

Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina - SC, Brasil.

PANDITHAGE, R., 2012. "Brief Introduction to Critical Point Drying," *Leica Microsystems*, pp. 2–5. Disponível em: <<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-critical-point-drying/>>. Acesso em: 9 dez. 2016

PARK, J. H., BYUN, J. Y., SHIM, W. B., KIM, S. U., KIM, M. G., 2015. "High-sensitivity detection of ATP using a localized surface plasmon resonance (LSPR) sensor and split aptamers", *Biosensors and Bioelectronics*, v.73, pp. 26–31

PASTERNAK, J., 2012. "Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF", *Einstein*, (São Paulo), v.10, n.11, pp. 118–19.

PEREIRA, R.E.P., PETRECHEN, G.G., 2011. "Principais Métodos Diagnósticos Bacterianos-Revisão de Literatura". *Revista científica do Setor de medicina veterinária*, Ano IX, n.16, (Jan).

PCR. Disponível em: <http://ib.bioninja.com.au/_Media/pcr-components_med.jpeg>. Acesso em 12 dez. 2016.

PIMENTEL, M. F., 1995. "Calibração: uma revisão para químicos analíticos", *Química Nova*, v. 19, n.3, pp. 268-277.

PINTO, J. T. M., AMARAL, K. J., JANISSEK, P., 2014. "Potencialidades da Análise de Fluxo de Materiais no Processo Produtivo de Fibras Ópticas Poliméricas", *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v.24, n.3, pp.324–31.

PISSUWAN, D., CORTIE, C. H., VALENZUELA, S. M., CORTIE, M. B., 2010. "Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria", *Trends in Biotechnology*, v.28, n.4, pp.207–13.

PLASMONICS AND ULTRAFAST NANOOPTICS. Disponível em: <<http://www.ucd.ie/biophysics/surfaceplasmons.html>> Acesso em 30 jan.2017.

PORTAL DA SAÚDE, 2015. "Doenças Transmitidas por Alimentos Doença Transmitidas por Alimentos". pp.1-3.

RA, M., GADE, A., GAIKWAD, S., MARCATO, P., DURÁN, N., 2012. "Biomedical applications of nanobiosensors: The state-of-the-art", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.23, n.1, pp.14–24.

RANGEL, J. M., SPARLING, P. H., CROWE, C., GRIFFIN, P. M., SWERDLOW, D. L., 2005. "Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks", *Emerging Infectious Diseases*, v.11, n.4, pp. 603-609.

REZNICKOVA, A., NOVOTNA, Z., KASALKOVA, N. S., SVORCIK, V., 2013. "Gold nanoparticles deposited on glass: physicochemical characterization and cytocompatibility," *Nanoscale research letters*, v.8, n.1, pp.252.

RICA, R., STEVENS, M. M., 2012. "Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye", *Nature Nanotechnology*, v.8, n.9, pp.1759–64.

RIJAL, K., LEUNG, A., SHANKAR, P. M., MUTHARASAN, R., 2005. "Detection of pathogen *Escherichia coli* O157:H7 at 70 cells/mL using antibody-immobilized biconical tapered fiber sensors", *Biosensors and Bioelectronics*, v.21, n.6, pp.871–80.

RIVAS, M., 2012. "Vigilancia epidemiológica y molecular del SUH asociado a *Escherichia coli* productor de toxina *Shiga*", Simpósio Síndrome Urémico Hemolítico. Buenos Aires, Argentina, 21 a 23 de Junho de 2012.

RIVEIRO, M. A., PADOLA, N. L., ETCHEVERRIA, A. I., PARMA, A. E., 2004 “*Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina”. *Medicina*, v.64, n.4, pp.352–56.

RODRIGUES, D. M. C., 2013. Desenvolvimento e Caracterização de Sensores a fibra óptica plástica para refratometria baseados em modulação de amplitude. Dissertação, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ROEHE, P. M., 1999. “Curso de virologia”. Curso de Virologia Básica, n.1992, pp.1–21.

RONOT-TRIOLI, C., TROUILLET, A., VELLAS, C., GAGNAIRE, E. H., 1996 “Monochromatic excitation of surface plasmon resonance in an optical-fibre refractive-index sensor”, *Sensors and Actuators, A: Physical*, vol. 54, no 1–3, p. 589–593.

ROUSHANI, M., VALIPOUR, A, M., 2016. “Layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and cysteamine on gold electrode for immunosensing of human chorionic gonadotropin at picogram levels”, *Materials Science and Engineering: C*, v.61, pp.44–50.

SÁ, T.F.F.C., 2013. Estudo da Presença de *Escherichia coli* O157:H7 em Vegetais Pela Técnica Neutronográfica. Dissertação, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SAHA, K., AGASTI, S. S., KIM, C., LI, X., ROTELLO, V. M., 2012. “Gold nanoparticles in chemical and biological sensing”, *Chemical Reviews*, v.112, n.5, pp.2739–79.

SAI, V. V. R., KUNDU, T., DESHMUKH, C, TITUS, S., KUMAR, P., MUKHERJI, S., 2010. “Label-free fiber optic biosensor based on evanescent wave absorbance at 280 nm”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, v.143, pp.724–30.

SAI, V. V. R., KUNDU, T., MUKHERJI, S., 2009. “Novel U-bent fiber optic probe for localized surface plasmon resonance based biosensor”, *Biosensors and Bioelectronics*, v.24, n.9, pp.2804–9.

SANTANA, R. J., 2011. Desenvolvimento de filme fino de a-Si:H por pulverização catódica para aplicações fotovoltaicas. Dissertação, Engenharia de Materiais da (REDEMAT)/UFOP, Puro Preto, SP, Brasil.

SARTZ, L., DE JONG, B., HJERTQVIST, M., PLYM-FORSHELL, L., ALSTERLUND, R., LOFDAHL, S., OSTERMAN, B., STAHL, A., ERIKSSON, E., HANSSON, HB., KARPMAN, D., 2008. “An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination,” *Epidemiology and infection*, v.36, n.3, pp.370–80.

SATACH-MACHADO, D. R., KUBOTA, L. T., MENDES, R. K., 2010. “Biossensor para Detecção Precoce da Ferrugem Asiática na soja”, *DSpace/Manakin Repository Patente*, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

SATIJA, J., PUNJABI, N. S., SAI, V. V. R., MUKHERJI, S., 2014. “Optimal design for U-bent fiber-optic LSPR sensor probes”, *Plasmonics*, v.9, n.2, pp.251–60.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. "Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria: Classificação de Bactérias Fitopatogênicas utilizando técnicas baseadas em DNA", Editora da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, pp. 235-268, 2002.

SERRA, P. A. "Biosensors", *Intech, Vukovar, Croatia*, pp.302, 2010. Disponível em: <<http://cd.n.intechweb.org/pdfs/6910.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

SHAN, S., LIU, D., GUO, Q., WU, S., CHEN, R., LUO, K., HU, L., XIONG, Y., LAI, W., 2016. “Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on cascade signal amplification in ELISA”, *Journal of Dairy Science*, v.99, pp.7025–32.

- SILVA, M. C., 2002. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos com a Utilização de Metodologias Convencionais e do Sistema Simplate. Dissertação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo-USP, Piracicaba, SP, Brasil.
- SJOLING, Å., SADEGHIPOORJAHROMIA, L., NOVAKC, D., TOBIAS, J., 2015. "Detection of major diarrheagenic bacterial pathogens by multiplex PCR panels", *Microbiological Research*, v.172, pp.4–40.
- STEEL, A. B., HERNE, T. M., TARLOV, M. J., 1998. "Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold", *Analytical Chemistry*, v.70, n.22, pp.4670–77.
- SUO, Z., YANG, X., DELIORMAN, M., CAO, L., AVCI, R., 2012. "Capture efficiency of *Escherichia coli* in fimbriae-mediated immunoimmobilization", *Langmuir*, v.28, n.2, pp.1351–1359.
- TAKEO, T., HATTORI, H., 1982. "Optical fiber sensor for measuring refractive index", *Japanese Journal of Applied Physics*, v.21, n.10, pp.1509–12.
- TATSCH, J. P., 2000. "Deposição de filmes finos", Oficina de Microfabricação: Projeto e Construção de CI's MOS, Cap. 11, Centro de componentes Semicondutores da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- TAYLOR, A. D., LADD, J., YU, Q., CHEN, S., HOMOLA, J., JIANG, S., 2006. "Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor", *Biosensors and Bioelectronics*, v.22, n. 5, pp.752–58.
- TEHA, H. F., GONGA, H., DONGB, X., ZENG, X., TANC, A. L. K., YANGA, X., TAND, S. N., 2005. "Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface", *Analytica Chimica Acta*, v.551, pp.23–29.
- THERMO FISCHER. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2>>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- TORRES A.G., ARENAS-HERNÁNDEZ, M., MARTÍNEZ-LAGUNA, Y. Overview of *Escherichia coli*. Torres AG, editor, Pathogenic *Escherichia coli* in latin America. Bentham Science Publishers, 2010. p. 1–7.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. "Microbiologia". Editora Artmed, 10o ed., Porto Alegre-RS, pp.196-204 , 2012.
- TROUILLET, A., RNOT-TRIOLI, C., VEILLAS, C., GAGNAIRE, H., 1996. "Chemical sensing by surface plasmon resonance in a multimode optical fibre", *Pure and Applied Optics: Journal of the European Optical Society Part A*, n.5, pp.227–237.
- VIEIRA, L.D.S., 2002. "Síntese e Caracterização de Nanopartículas de ouro e Encapadas com Prata," Universidade do Vale do Paraíba- UniVap Faculdade, p.25.
- VRANJAC, A., 2011. "Síndrome Hemolítico - Urêmica e *Escherichia coli* O104:H4 e o surto na Alemanha", *Vigilância Epidemiológica*, pp.1–17.
- WAECHTER, H., LITMAN, J., CHEUNG, A. H., BARNES, J. A., LOOCK, H. P., 2010. "Chemical sensing using fiber cavity ring-down spectroscopy", *Sensors*, v.1, n.3, pp.1716–42.
- WANDERMUR, G., RODRIGUES, D., ALLIL, R., QUEIROZ, V., PEIXOTO, R., WERNECK, M., MIGUEL, M., 2014. "Biosensors and Bioelectronics Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection", *Biosensors & bioelectronics*, v.54, pp.661–66.
- WANDERMUR, G., 2014. "Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection". *Biosensors and Bioelectronics*, v.54, pp.661–66.

- WANDERMUR, G. L., 2013. “Imunossensor óptico para detecção rápida de microrganismos em água”. Dissertação, *Biotechnologia Vegetal*, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- WASWA, J., IRUDAYARAJ, J., DEBROY, C., 2007. “Direct detection of E. Coli O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor”, *LWT - Food Science and Technology*, v.40, n.2, pp.187–92.
- WATANABE, Y., OZASA, K., MERMIN, J.H., GRIFFIN, P. M., MASUDA, K., IMASHUKU, S., SAWADA, T., 1999. “Factory outbreak of O157:H7 infection in Japan”, *Emerging Infectious Diseases*, v.5, n.3, pp.424–28.
- WERNECK, M., LOPES, R., G., D. R., ARCAS, A., DUTRA, F., QUEIROZ, V.; ALLIL, R., 2016. “Fiber optic sensors – POF Biosensors Based on Refractive Index and Immunocapture Effect”. In New York, pp. 69-94.
- WHO, 2015. “World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe”, pp. 1–3. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>>. Acesso em: 13 ago. 2016.
- YANASE, Y., SAKAMORO, K., KOBAYASHI, K., HIDE, M., 2016. “Diagnosis of immediate-type allergy using surface plasmon resonance”, *Optical Materials Express*, v.6, n.4, pp.1339.
- YANG, P., PORTALÈS, H., PILENIA, M. P., 2011. “Dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal quasispherical nanoparticles on their crystallinity-related morphologies”, *Journal of Chemical Physics*, v.134, n.2, pp.1–6.
- YOO, J. H., WOO, D. H., CHUN, M. S., CHANG, M. S., 2014. “Microfluidic based biosensing for Escherichia coli detection by embedding antimicrobial peptide-labeled beads”, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v.191, n.(October 2014), pp.211–18.
- ZIBAIL, M. I., KAZEMI, A., LATIFI, H., AZAR, MK., HOSSEINI, SM. GHEZELAIAGH, M. H., 2010. “Fiber optics biosensor fabricated for measuring the growth rate of Escherichia coli K-12 in the aqueous”, *Physics*, v.7653, pp.1–4.
- ZIBAIL, M. I., KAZEMI, A., LATIFI, H., AZAR, MK., HOSSEINI, S. M., GHEZELAIAGH, MH.2010. “Measuring bacterial growth by refractive index tapered fiber optic biosensor”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 101(3):313–20.
- ZIBAIL, M. I., LATIFI, H., ZAHRA, S, CHENARI, Z., 2014. “Nonadiabatic tapered optical fiber sensor for measurement of antimicrobial activity of silver nanoparticles against *Escherichia coli*”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.135, pp.55–64.
- ZOUROB, M., MOHR, S., GODDARD, N. J., 2008. “Integrated Deep-Probe Optical Waveguides for Label Free Bacteria Detection”, *Sensors Journal IEEE*, v.1, n.514, pp.139–68.
- ZOUROB, M., ELWAY, S., TURNER, A.P.F. “Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors, and microsystems”, Springer, New York, 2008.

Apêndice A – Publicação e participação em Congressos

A.1 CAPÍTULO DE LIVRO

WERNECK, M., LOPES, R., G., D. R., ARCAS, A., DUTRA, F., QUEIROZ, V.; ALLIL, R., 2016. “Fiber optic sensors – POF Biosensors Based on Refractive Index and Immunocapture Effect”. In New York, pp. 69-94.

A.2 PÔSTERES

ARCAS, A. S; WERNECK, M. M; ALLIL, R. C. “NANOBIOSSENSOR A FIBRA ÓPTICA PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA *Escherichia coli*.” *Simpósio de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Mato Grosso, SIMCITAL 2016*, 11, a 13 de setembro de 2016, Cuiabá, MT, Brasil. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/0Bwcp8fDeU3HjbkZsY1IxSHVpa1U/view>>.

ARCAS, A. S; WERNECK, M. M; ALLIL, R. C.; LOPES, R. “Biossensor com filme fino de ouro para detecção de bactérias.”. *Simpósio Nacional de Nanobiotecnologia, SNNB, 2016*, 1 e 2 dezembro de 2016, Belo Horizonte, MG, Brasil. Disponível em: <<https://www.nanobmrg.com/snnb>>.

A.3 APRESENTAÇÃO ORAL

ARCAS, A. S; DUTRA, F.S.; WERNECK, M. M; ALLIL, R. C. “Fiber-optic sensor for bacteria detection based on intensity-modulated SPR by monochromatic excitation”. *TechConnect World Innovation Conference and Expo*, 15-17 de maio de 2017, Washington, D.C, U.S.A.