NANOBIOSSENSOR POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS

Ariadny da Silva Arcas

Tese de Doutorado 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 Doutora em Engenharia da Nanotecnologia.

Orientadores: Marcelo Martins Werneck
Regina Célia da Silva Barros Allil

Rio de Janeiro
Março de 2022

NANOBIOSSENSOR POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS

Ariadny da Silva Arcas

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

Orientadores: Marcelo Martins Werneck
Regina Célia da Silva Barros Allil

Aprovada por: Prof. Marcelo Martins Werneck
Profª. Regina Célia da Silva Barros Allil
Profª. Ariane de Jesus Sousa Batista
Profª. Maria José Pontes
Prof. Marco Antônio Lemos Miguel
Dr. Alex Dante

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
MARÇO DE 2022

Arcas, Ariadny da Silva

Nanobiossensor por Ressonância Plasmônica de Superfície para Detecção de Patógenos/Ariadny da Silva Arcas – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2022.

XII, 104 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Marcelo Martins Werneck

Regina Célia da Silva Barros Allil

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia da Nanotecnologia, 2022.

Referências Bibliográficas: p. 85-101.

1. Nanobiossensores. 2. SPR. 3. LSPR 4. Fibra Óptica I. Werneck, Marcelo Martins *et al*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia da Nanotecnologia. III. Título.

Dedicatória

Dedico esta tese 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 aos professores orientadores Marcelo Werneck e Regina Allil pela orientação, apoio, conselhos e confiança.

A toda equipe do Laboratório de Instrumentação e Fotônica pela ajuda e auxílio na produção deste trabalho, à Lizeth, ao Fábio, à Vanessa, à Rafaela, ao Renato, ao Roberto, ao Juan, ao Alex, ao Arthur, ao Gabriel, ao Daniel e ao Vinícius.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos coordenado pelo Prof. Dr. Marco Miguel e ao Laboratório de Microbiologia coordenado pelo professor José Peralta, ambos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia (PENt) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo representado pelo Prof. Dr. Tiago Albertini Balbino, pela Professora Luciana Spinelli Ferreira e pelo secretário do Programa Rafael Calazans.

Aos meus amigos do PENt.

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

À FAPERJ pelo apoio financeiro e ao INMETRO Xerém-RJ pelo apoio técnico.

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

NANOBIOSSENSOR POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS

Ariadny da Silva Arcas

Março/2022

Orientadores: Marcelo Martins Werneck
Regina Célia da Silva Barros Allil

Programa: Engenharia da Nanotecnologia

A bactéria *Escherichia coli (E. coli)* e o parasita *Taenia solium (T. solium)* são microrganismos causadores de infecções em humanos. Os principais métodos de detecção dessas infecções consistem em análises laboratoriais realizadas por equipamentos e reagentes de custo elevado e ainda sim podem levar dias para concluírem os resultados. Neste contexto, esta pesquisa apresenta o desenvolvimento de nanobiossensores por suspensões de nanopartículas de ouro (AuNPs), por fibra óptica plástica (POF) em forma de "U" revestida com nanofilme de ouro e revestida com AuNPs para detecção da bactéria *E. coli* e *T. solium*. A POF e as nanoestruturas foram usados por permitirem o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico e detecção por monitoramento remoto e em tempo real em uma instrumentação precisa, de fácil manuseio e de baixo custo. O nanofilme foi produzido por deposição catódica em uma câmera de um *Sputtering* e as AuNPs por síntese química. Os sensores foram avaliados quando a estabilidade, a variabilidade e a sensibilidade. Os nanobiossensores a POF com nanofilme de ouro apresentou um limite de detecção para a bactéria *E. coli* de $1{,}5 \times 10^3$ UFC/mL. A suspensão de AuNPs contendo anticorpo para a captura de antígenos de *T. solium* apresentou um limite de detecção superior a 0,1 µg/mL, correspondendo a faixa de concentração indicativa de infecção. O nanobiossensor a POF contendo AuNPs apresentou sensibilidade de 159,43 nm/RIU. Portanto, esses resultados demonstram que esta tecnologia pode ser uma eficiente ferramenta para análise de rotina em amostras clínicas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

NANOBIOSENSOR BY SURFACE PLASMONIC RESONANCE FOR PATHOGENS DETECTION

Ariadny da Silva Arcas

March/2022

Advisors: Marcelo Martins Werneck
Regina Célia da Silva Barros Allil

Departament: Nanotechnology Engineering

The bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*) and the parasite *Taenia solium* (*T. solium*) are microorganisms that cause infections in humans. Their main detection methods consist of laboratory analyzes carried out by expensive equipment and reagents, and even so, it can take days to complete the results. In this context, this research presents the design of nanobiosensors by suspensions of gold nanoparticles (AuNPs) and by plastic optical fiber (POF) in a "U" shape coated with either gold nanofilm or coated with AuNPs for *E. coli* and *T. solium* detection. POF and nanostructures were used because they allow the development of diagnosis and detection systems by remote monitoring and in real time in an easy-to-handle instrumentation, accurate, and low costly. The nanofilm was produced by cathodic deposition in a sputtering chamber and the AuNPs by chemical synthesis. The sensors were evaluated for stability, variability, and sensitivity. The POF nanobiosensors with gold nanofilm showed a detection limit for *E. coli* bacteria of 1.5 x 10^3 CFU/mL. The AuNPs suspension containing antibody for the capture of *T. solium* antigens showed a detection limit higher than 0.1 µg/mL, corresponding to the concentration range found in human blood. The POF nanobiosensor containing AuNPs showed a sensitivity of 159.43 nm/RIU. Therefore, one tool turns out that this technology can be efficient for routine analysis in scheduled clinics.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 4
    2.1. OBJETIVO GERAL 4
    2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
    3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS 5
    3.2 NANOSSENSORES 8
    3.3 FUNDAMENTOS DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA 11
    3.3.1 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR) 12
    3.3.2 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA 14
    3.4 FIBRA ÓPTICA PLÁSTICA 15
    3.4.1 PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DA POF 17
    3.4.2 CAMPO EVANESCENTE 17
    3.4.3 SENSORES POF EM FORMA DE ‘U’ 19
    3.5 NANOFILME DE OURO 20
    3.6 IMOBILIZAÇÃO DE NANOFILMES DE OURO 22
    3.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO (AUNPS) 24
    3.7.1 SÍNTESE DE AUNPS 25
    3.7.2 FUNCIONALIZAÇÃO DE SUSPENSÕES DE AUNPS 28
    3.8 CARACTERIZAÇÃO 31
    3.8.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO 31
    3.8.2 NANOFILME DE OURO 32
    3.9 DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS 32
    3.9.1 ESCHERICHIA COLI 33
    3.9.2 TAENIA SOLIUM 39
4. MATERIAIS E MÉTODOS 43
    4.1 REAGENTES QUÍMICOS 43
    4.2 MATERIAL BIOLÓGICO 44
    4.3 NANOBIOSSENSOR POR SPR 44
    4.3.1 CONSTRUÇÃO DO SENSOR 44
    4.3.2 CARACTERIZAÇÃO 49
    4.4 NANOBIOSSENSOR POR LSPR 49
    4.4.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO 50
    4.4.2 SENSIBILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO 52

4.4.3 PROTOCOLO DE FUNCIONALIZAÇÃO - SENSOR 1 52
4.4.4 DETECÇÃO DO ANTÍGENO DE T. SOLIUM - SENSOR 1 54
4.4.5 TESTES COM SORO HUMANO - T. SOLIUM - SENSOR 1 55
4.5 CARACTERIZAÇÃO - SENSOR 1 55
4.5.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS 55
4.5.2 MICROSCOPIA 56
4.5.3 POTENCIAL ZETA 56
4.6 NANOBIOSSENSOR POF EM "U" COM AUNP - SENSOR 2 56
4.6.1 FABRICAÇÃO DO NANOBIOSSENSORE POF EM "U" 56
4.6.2 FUNCIONALICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO - SENSOR 2 57
4.6.3 ESPECTROSCOPIA UV-VIS - SENSOR 2 60

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 61
5.1 NANOBIOSSENSOR POR SPR 61
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO NANOFILME DE OURO 61
5.1.2 SENSIBILIDADE – SPR 61
5.1.3 DETECÇÃO DA BACTÉRIA E. COLI - SPR 62
5.1.4 TESTES DE SELETIVIDADE PARA A BACTÉRIA E. COLI 64
5.1.5 CARACTERIZAÇÃO - SPR 65
5.2 SENSOR POR LSPR – SENSOR 1 66
5.2.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO 66
5.2.2 FUNCIONALIZAÇÃO DAS AUNPS E DETECÇÃO DE T. SOLIUM 70
5.2.3 TESTE DE ESTABILIDADE E DA VARIABILIDADE DO PROCESSO 73
5.2.4 CONJUGAÇÃO COM ANTICORPOS E TESTES COM T. SOLIUM 75
5.2.5 TEMPO DE RESPOSTA, SELETIVIDADE E SENSIBILIDADE 76
5.2.6 TESTE COM SORO HUMANO 80
5.3 SENSOR POR LSPR – SENSOR 2 81

6. CONCLUSÃO 83
6.1 TRABALHOS FUTUROS 84

7. REFERÊNCIAS 85

Lista de Sigas e abreviações

Ac - Anticorpo

AFM - Microscópio de Força Atômica

Ag - Antígeno

$AgNO_3$ -Nitrato de prata

APTES - 3-Aminopropil Triethoxisilano

Au^0 - Ouro metálico

Au^{+3} - Íons de ouro

AuNPs-Ac - Suspensão coloidal de nanopartículas de ouro com anticorpos

AuNPs-Cys - Suspensão coloidal de nanopartículas de ouro aminadas

Au-SR – Radical tiolato

BME - 2-mercaptoetanol

BSA - Albumina de Soro Bovino

C_2H_6O - Álcool etílico absoluto

C_2H_7NS - Cisteamina

C_3H_8OH - Álcool isopropílico

$C_4H_{12}N_2S_2.2HCl$ - Dicloridrato de cistamina

$C_6H_8O_6$ - Ácido ascórbico

$C_{12}H_{12}O_{11}$ - Sacarose

CO_2 – Dióxido de carbono

$CONH_2$ - Grupo funcional amida

COOH - Grupo funcional ácido carboxílico

$COOCH_3$ – Grupo funcional etanoato de etila

CTAB – Brometo de Cetiltirmetilamônio

CV- Coeficiente de variação

Cys - Dicloridrato de cistamina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

D_P – Profundidade de penetração

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

DTHA - Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar

EAEC - *Escherichia coli enteroagregativa*

E. coli - *Escherichia coli*

EDAC - N-(3-dimetilaminopropil)-N’-carbodiimida

EDC - 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EEC - *E.coli enteropatogênica*

EITB - Ensaio de Imunoeletrotransferência Ligada a Enzima *Blot*

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPEC - *Escherichia coli O55 enteropatogênica*

FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz

Film-Au – Nanofilmes de ouro

H_2 - Hidrogênio

$HAuCl_4$ - Ácido tetracloroaúrico III ou sal de ouro

$HAuCl_4.3H_2O$ - Tetrachloroaurate de hidrogênio III, tetracloroaurato III ou sal de ouro

IN - Instrução Normativa

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IR - Índice de Refração

KH_2PO_4 - Fosfato de potássio monobásico

LCR - Líquido Cefalorraquidiano

LED – Diodo emissor de luz

LSPR - Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada

MCMS - Método de Crescimento Mediado por Semente

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

MHDA - Ácido 16-mercaptohexadecanoíco

MO - Microscópio Ótico

mV - Milivolts

MUA - Ácido mercaptoundecanóico

$NaBH_4$ -Borohidreto de Sódio

$Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ - Citrato de sódio di-hidratado

NaCl - Cloreto de sódio

NH_2 - Grupo funcional amina

NaOH - Hidróxido de sódio

Na_2HPO_4 - Fosfato de sódio dibásico

NCC - Neurocisticercose

NH_2 – Radical amina

NHS - N-Hidroxisuccinimida

NMP - Número Mais Provável

NPs - Nanopartículas

OSA - Analisador de Espectro Óptico

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RIU – Unidade de Índice de Refração

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido ribonucleico

Rpm - rotações por minuto

P/V - Peso por volume

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PEG – Polietilenoglicol

PLA - Poliácido Láctico

PLD - Deposição por Laser Pulsado

PH - Potencial Hidrogeniônico

PMMA -Polimetilmetacrilato

POF – Fibra Óptica Plástica

PVD - Deposição Física de Vapor

PVP - Polivinilpirrolidona

SEM - Microscópio Eletrônico de Varredura

SH – Radical tiol

SP - Plasmóns de Superfície

SPR - Ressonância Plasmônica de Superfície

STEM - Microscópio Eletrônico de Varredura por Transmissão

Sulfo-NHS - N-hidroxissulfosuccinimida

TEM - Microscópio Eletrônico de Transmissão

TIR -Reflexão Interna Total

TSA - Ágar Triptona de Soja

TSB - Caldo Tríptico de Soja

T. solium – Taenia solium

TC - Tomografia Computadorizada

UFC/g - Unidades Formadoras de Colônias por gramas

UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias por mL

UV-Vis - Ultravioleta-visível

VF-Tso - Fluido Vesicular de *T. solium*

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem atraído considerável atenção nos últimos anos, despertando interesse da comunidade científica nas áreas da física [1], química, Ciência da Computação, Engenharia, Biologia [2] e principalmente da Medicina [3].

Nanotecnologia pode ser definida como a manipulação e a aplicação de estruturas entre 1 a 100 nanômetros (nm) em pelo menos uma de suas dimensões, onde nesta escala os materiais exibem propriedades únicas [4].

Os nanomateriais podem ser sintetizados em diversas geometrias, desde esferas, bastões, nanofilmes e tubos. Sua grande razão entre a área superficial e volume os torna mais reativos e adequados para funcionalização ou imobilização de sua superfície, permitindo o acoplamento de moléculas, uso em tratamento terapêutico [3] ou para diagnóstico.

Nos últimos anos, a compreensão do efeito da Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) e a Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR), que explica o comportamento óptico destes nanomateriais, resultou em grandes avanços nesta área como o desenvolvimento dos nanobiossensores [5], dispositivos que convertem eventos biológicos ou moleculares em um sinal mensurável [6]. Sua sensibilidade está atrelada às percepções das variações de índice de refração (IR) do ambiente químico circundante [7], funcionando como um amplificador do sinal detectável, e convertendo essas alterações, em mudanças espectrais de absorbância ou transmitância [8].

O IR do meio, pode ser melhor percebido alterando as características do nanomaterial, tais como: tamanho, forma [9], condutividade, funcionalização para a ligação seletiva e detecção de moléculas e alvos biológicos [10]. Esses nanomateriais também funcionam como suporte para o elemento de reconhecimento, podendo ser empregadas nanopartículas, nanotubos de carbono [10, 11] além dos nanofilmes.

As propriedades fotoluminescentes e ópticas dos nanomateriais possibilitam o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico e detecção de resposta rápida [12], de baixo custo (pelo uso de baixas concentrações do material que constitui a sonda e o elemento de reconhecimento) [11], permitem a realização de múltiplas análises clínicas personalizadas e de diagnósticos precisos em um só dispositivo [6].

Dentre os sistemas de diagnósticos e detecção de patógenos os que empregam nanotecnologia junto com fibras ópticas têm sido amplamente explorados, devido principalmente a capacidade de monitoramento em tempo real, instrumentação compacta,

acessibilidade, precisão, monitoramento remoto, facilidade de manuseio e de acoplamento [13].

Neste âmbito, a nanotecnologia e sistemas a fibra óptica plástica é uma forte aliada para a detecção de infecções bacteriológicas e parasitárias em humanos e, que são a principal causa do aumento significativo na patogênese e morte em todo o mundo, superando até mesmo as doenças como o câncer [14]. Entre as doenças infecciosas e parasitárias, as causadas pelo parasita *T. solium* e pela bactéria *Escherichia coli* se destacam por se tratarem de doenças tropicais comumente negligenciadas e de demorado diagnóstico.

A *Taenia solium* (*T. solium*) é um parasita que tem os suínos como hospedeiro intermediário e os humanos como definitivo, onde é responsável por duas doenças distintas: a teníase e a cisticercose [15]. A teníase é causada pelo consumo de carnes bovinas ou suínas cruas ou mal cozida contendo larvas da *Taenia*, onde no intestino humano se desenvolvem causando infecções [16]. Já a cisticercose é uma doença desencadeada pela ingestão de água ou o consumo de alimentos contaminados com ovos da *T. solium*, ou popularmente conhecida por solitária. No organismo, os ovos podem se romper liberando a larva conhecida por cisticerco, e que ao atingir a corrente sanguínea alcançam vários órgãos [17].

Em 2015 no mundo cerca de 2,56 a 8,30 milhões de pessoas foram acometidas pelo parasita *T. solium* [18-20]. Contudo, essa estatística pode ser ainda maior, tendo em vista que muitos casos não são devidamente diagnosticados [15].

O diagnóstico para *T. solium* é atualmente baseado em um conjunto de técnicas e equipamentos que requer: a coleta de fezes ou de material da região anal para exames parasitológicos, a coleta do soro e líquido cefalorraquidiano para ensaios imunológicos como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e o Ensaio de Imunoeletrotransferência Ligada a Enzima *Blot* (EITB) [21]; imagens cerebrais para a identificação do cisticerco em várias fases de desenvolvimento, tais como a Tomografia Computadorizada (TC) [15], avaliação clínica, epidemiológica [22] e dados radiológicos com o uso da Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Portanto, o controle da teníase e da cisticercose e de outras infecções dependem das condições econômicas, sociais e culturais de cada região e país [23, 24].

Diferentemente do parasita *T. solium* a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é um microrganismo presente naturalmente na microbiota do intestino de animais de sangue quente, inclusive o do homem [25]. Contudo, quando presente em alimentos ou na água

de consumo, indica contaminação direta de origem fecal e a depender do sorotipo da bactéria, podem apresentar potencial patogênico, podendo inclusive levar à morte [26].

No Brasil entre 2007 a 2020, foram notificados, por ano, uma média de 662 surtos por Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA). Entre os surtos notificados, os mais prevalentes estão as bactérias *Escherichia coli* com 35,7 % dos casos, a Salmonella com 14,9 % e o *Staphylococcus* com 11,5 % [27].

Os surtos pela bactéria *E. coli* vem crescendo, e dentre as espécies que foram diagnosticadas prevaleceram as espécies de *E. coli enteropatogênica* (EPEC), *enteroagregativa* (EAEC) e *E. coli* ssp. [28]. Contudo, o número de casos e de espécies da bactéria podem ser ainda maiores, tendo em vista que nem todos os casos de infecção são devidamente diagnosticados. Deste modo, o desenvolvimento de sistemas de detecção da bactéria, cada vez mais eficazes, portáteis, de resposta mais rápida, mais práticos que as técnicas convencionais [18-20] e com menores custos de análise, continua sendo uma necessidade [6, 10].

Neste contexto, esse trabalho propõe o desenvolvimento de três nanobiossensores por Ressonância Plasmônica para detecção desses patógenos. O primeiro nanobiossensor consiste no uso de fibras ópticas plásticas (POF) em forma de "U" revestido com um nanofilme de ouro, imobilizado com anticorpos para a captura e detecção da bactéria *E. coli*. A captura da bactéria pelo anticorpo resulta em mudanças do índice de refração no meio local circundante e em alterações de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), que foram medidos empregando um *setup* eletrônico por modulação de intensidade da luz transmitida pela POF.

O segundo e o terceiro nanobiossensores foram desenvolvidos para funcionarem pelo princípio de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR). O segundo sensor consiste nas sínteses de suspensões coloidais de nanopartículas de ouro (AuNPs) por duas rotas químicas: a por *Turkevich* e pelo de Crescimento Mediado por Semente (MCMS). Em seguida as suspensões coloidais foram caracterizadas, aminada, funcionalizadas e empregadas na detecção de antígenos do parasita *T. solium*.

O terceiro nanobiossensor, consiste no uso de Fibra Óptica Plástica (POF) moldados em forma de "U" com a extremidade e região sensível imobilizadas com nanopartículas de ouro. As AuNPs na superfície da POF foram aminadas, e imobilizadas com anticorpos específicos para a captura e detecção de antígenos do parasita *T. solium*.

Finalmente, após os ensaios, o nanobiossensores foram avaliados quando a estabilidade, a variabilidade e a sensibilidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanobiossensores por Ressonância Plasmônica para detecção de patógenos como alternativa portátil e de resposta rápida.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver nanobiossensores por Ressonância Plasmônica para:

a) Detecção da bactéria *E. coli*;

- Caracterizar o nanossensor revestido com o nanofilme, incluindo sua sensibilidade à variação do índice de refração do meio circundante;
- Avaliar o protocolo de imobilização biológica;
- Testar o nanobiossensor na detecção e seletividade para a bactéria *E. coli;*

b) Detecção de antígenos do parasita *T. solium*;

- Sintetizar e avaliar a síntese de AuNPs usando duas rotas químicas diferenciadas;
- Caracterizar as nanopartículas (NPs) sintetizadas, incluindo sua sensibilidade a variação do índice de refração;
- Avaliar as sínteses de AuNPs com melhor compatibilidade bioquímica e estabilidade para o desenvolvimento do nanobiossensor;
- Avaliar o protocolo de imobilização biológica;
- Testar o nanobiossensor na detecção e seletividade para a detecção de *T. solium*;
- Construir o sensor a POF em forma de “U” imobilizado com AuNPs;
- Testar a estabilidade e sensibilidade a variação do índice de refração do sensor POF com AuNPs;
- Avaliar o protocolo de imobilização biológica;
- Imobilização biológica e testes com o sensor POF em forma de “U” com AuNPs para a detecção de *T. solium*;
- Comparar a sensibilidade e o funcionamentos dos nanobiossensores desenvolvidos para a detecção de antígenos de *T. solium*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS

No final de 1959, o físico Richard Feynman, palestrava a concepção de que: "Existe muito espaço lá embaixo" traduzida do inglês "*There is plenty of room at the bottom*," e que posteriormente foi considerada a primeira palestra sobre tecnologia e engenharia na escala atômica [29]. Feynman, acreditava na possibilidade do controle e da manipulação da matéria em escala atômica, e que esta, permitiria o surgimento de uma infinidade de propriedades possíveis para as substâncias [30].

Cinquenta anos depois, suas ideias foram consideradas as precursoras para o surgimento de um novo campo de estudo, o da nanotecnologia.

A nanotecnologia atualmente é definida como o ramo da Ciência e da Engenharia dedicado à caracterização, a manipulação e a aplicação da matéria em escala entre 1 a 100 nanômetros (nm), onde nesta condição os materiais exibem propriedades únicas que são aproveitadas na produção de novos dispositivos, estruturas e materiais [4, 31]. E a nanociência ao estudo desses nanomateriais [32].

Na última década, as atividades no campo da nanotecnologia têm sido intensamente estudadas [33], motivado pelo desenvolvimento e inovações nas propriedades dos nanomateriais. Neste contexto, as nanopartículas metálicas e os nanofilmes [34], tem atraído grande interesse [35] em virtude de suas características físico-químicas ajustáveis, tais como: ponto de fusão, molhabilidade, condutividade elétrica e térmica [32], atividade catalítica [36], absorção de luz e dispersão [37, 38], o que tem resultado em diferentes características em relação às suas estruturas em macroescala.

Muitos nanomateriais existem na forma de dispersões coloidais, como as nanopartículas de ouro (AuNPs) que podem ser sintetizadas por diferentes processos, resultando em várias formas e tamanhos, tais como: nanoesferas [39], nanobastões [40, 41], nanoconchas [42], nanocubos [38], nanofios [37], *nanocluster*, nanoestrela [43], como podem ser vistos na Figura 1.

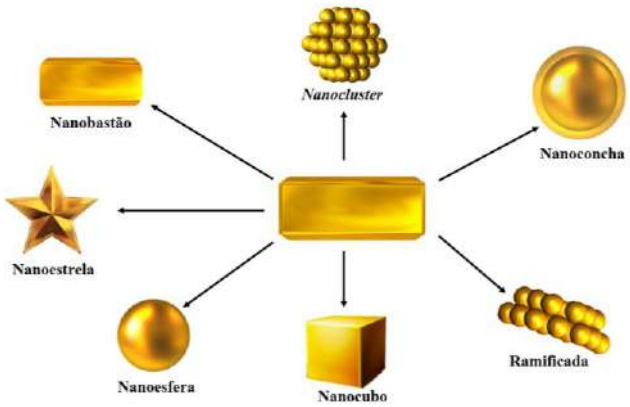


Figura 1 – Geometrias das nanopartículas de ouro. Fonte: Adaptado de [43].

Diferentes geometrias resultam em diferentes aplicações, reatividade e respostas à Ressonância Plasmônica.

O aumento da reatividade das NPs está atrelado a sua maior razão entre a área de superfície e o volume, onde mais átomos estarão disponíveis para interações com outros materiais ao seu redor (Figura 2.a), resultando em estruturas com propriedades únicas, se comparado com o mesmo elemento químico em macroescala [36], como podem ser vistos na Figura 2.b.

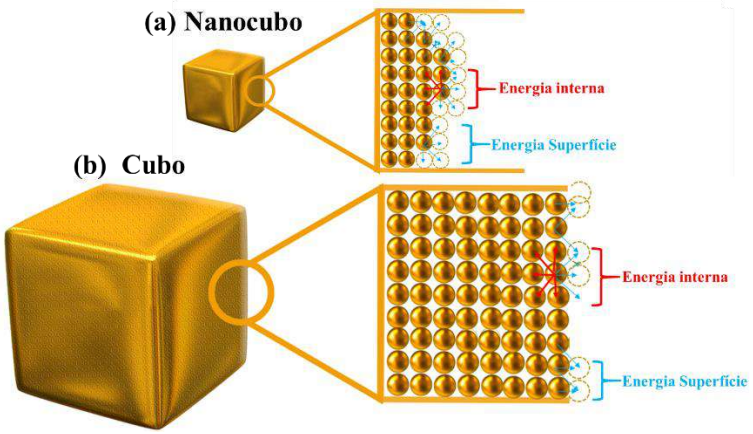
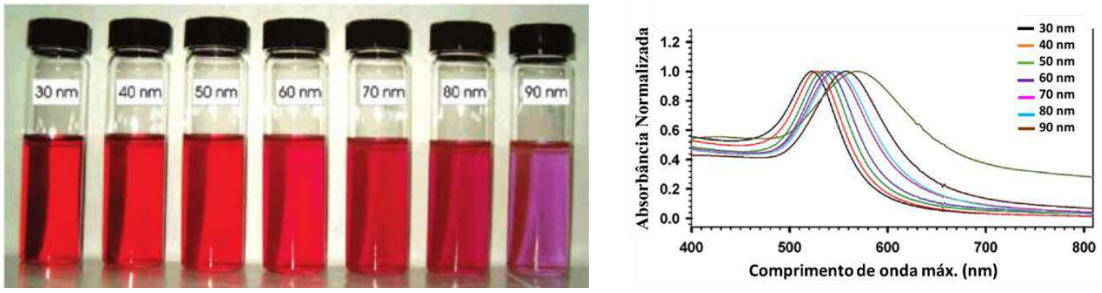


Figura 2 - Arranjo dos átomos em um: (a) nanocubo e um (b) cubo. Fonte: Adaptado de [44].

Na Figura 2 o cubo apresenta em relação ao nanocubo uma menor energia de superfície. Isso se deve ao arranjo dos átomos, onde neste caso a grande quantidade de átomos estão organizados a uma distância que minimiza as forças de interação entre eles, mantendo-os unidos em um estado de menor energia [45]. Os átomos localizados nas extremidades têm a sua energia de superfície compensada por toda cadeia de átomos do interior, minimizando assim a energia excedente. O mesmo não acontece com o nanocubo, onde a maioria dos átomos estão na superfície do material e apresentam sítios de coordenação livres [44, 46] e os átomos do interior (energia interna) não são numerosos o suficiente para compensar esse acréscimo de energia na rede atômica. Por este motivo as

nanopartículas ou nanoestruturas apresentam uma maior energia superficial, o que resulta em uma maior reatividade. Portanto, as NPs são pequenas o suficiente para confinar seus elétrons [31,47] e que sob determinadas condições, resultam em um fenômeno conhecido por Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada do inglês "*Localized Surface Plasmon Resonance"* (LSPR) [48] e que será abordado no item 3.3.2 deste capítulo.

Dentre as nanopartículas, as de ouro (AuNPs) tem sido recentemente utilizada, em virtude da sua biocompatibilidade, facilidade de síntese [33] e propriedades ópticas [49]. Em nanoescala, o movimento dos elétrons do ouro é restrito, resultando em diferentes reações em presença da luz e uma única e forte banda de absorção Ultravioleta-visível (UV-Vis) [31], associadas as dimensões da NPs, como podem ser vistos na Figura 3.



(a) (b)

Figura 3 -(a) Escala de cores das suspensões de AuNPs em diferentes tamanhos; (b) Espectro de absorbância em função do tamanho das AuNPs. Fonte: Adaptado de [50].

Na Figura 3.a quando a suspensão de AuNPs apresentam diâmetro próximo de 30 nm, sua cor é avermelhada [36]. Mas a depender do tamanho, forma, interações interpartículas, concentração das AuNPs em suspensão e índice de refração local [51,52] apresentam cores, propriedades [38] e espectro de absorbância característicos [53], como vistos na Figura 3.b. Em vista disso, o tamanho das NPs desempenha um papel importante na determinação da área de superfície [54] e, portanto, devem ser otimizados antes da aplicação como nanobiossensores [55].

A produção das suspensões coloidais de AuNPs, em sua maioria são por via química, que consiste na redução do ácido tetracloroaúrico ($HAuCl_4$) em presença de uma agente redutor forte que produz átomos de ouro para a formação das NPs. O tamanho das AuNPs pode ser controlado alterando as concentrações do agente redutor e/ou precursor ($HAuCl_4$), a temperatura que influenciará na cinética, a intensidade da força de ligação entre o agente de passivação ou surfactante [54], tempo, e do potencial hidrogeniônico (pH) [48]. Dentre esses, o controle do pH e da temperatura são considerados crítico para a obtenção de uma dispersão homogênea de tamanho [56], com baixo estado de agregação, alta concentração e estabilidade [57].

Os nanofilmes de ouro podem ser produzidos por diferentes técnicas, em várias espessuras resultando em filmes rígidos ou flexíveis e em diferentes cores em função da taxa de deposição. A cor azul claro, por exemplo, predomina nos nanofilmes com aproximadamente 3,5 nm de espessura e acima desta uma coloração dourada transparente a dourado espelhado [58, 59]. A Figura 4 mostra lâminas de vidros contendo nanofilmes de ouro, de diversas espessuras, depositados através da técnica de *Sputtering*.

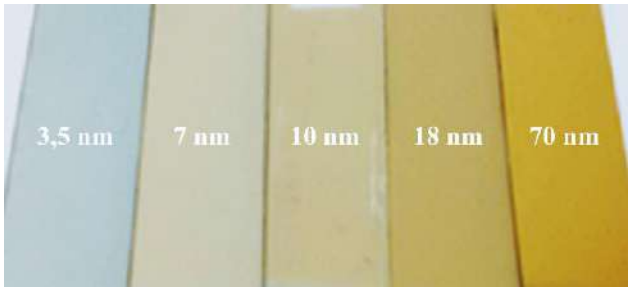


Figura 4 – Fotos de lâminas de vidro com deposição de nanofilmes de ouro de diversas espessuras.

Os nanofilmes diferem das NPs pela interação da luz com a superfície de um metal de espessura nanométrica, que em determinadas condições resultam na capacidade de propagação de luz sobre esta superfície resultando no efeito do SPR. Como nanossensores os nanofilmes permitem a medida por modulação de ângulo, de frequência ou de intensidade [60-62].

3.2 NANOSSENSORES

Ao longo dos último 20 anos, as pesquisas e aplicações com os nanossensores tem crescido consideravelmente, sendo avaliado em US$ 441,91 milhões de dólares em 2020, com uma previsão estimada de mercado de US$ 8.426,45 milhões de dólares em 2026 [63]. Esta tendência crescente do mercado global de nanossensores está sendo impulsionada pela demanda por produtos de qualidade, com baixo custo, tamanho compacto, maior confiabilidade e baixo consumo de energia. Além disso, apresenta-se como uma alternativa para a indústria farmacêutica, para a medicina, automotiva, energética, segurança militar [64-65] entre outros. As tendências geográficas do mercado mundial de nanossensores podem ser visualizados na Figura 5.



Figura 5 -Tendência de participação no mercado mundial de nanossensores entre 2019 a 2026. Fonte: Adaptado de [63].

Como vistos na Figura 5, os países da Américas do Norte e da Ásia apresentam forte tendência no desenvolvimento e participação no mercado de nanossensores, motivados pela necessidade de inovação na área da medicina, farmacêutica, militar, telecomunicação, industrial, alimentos, entre outras [63].

Um nanossensor consiste de um sistema de medição de dimensão nanométrica, contendo um elemento de reconhecimento que pode ser biológico, físico ou químico, e por um transdutor que permite interpretar os resultados [66]. Os principais elementos empregados no desenvolvimento dos nanossensores são vistos na Figura 6.

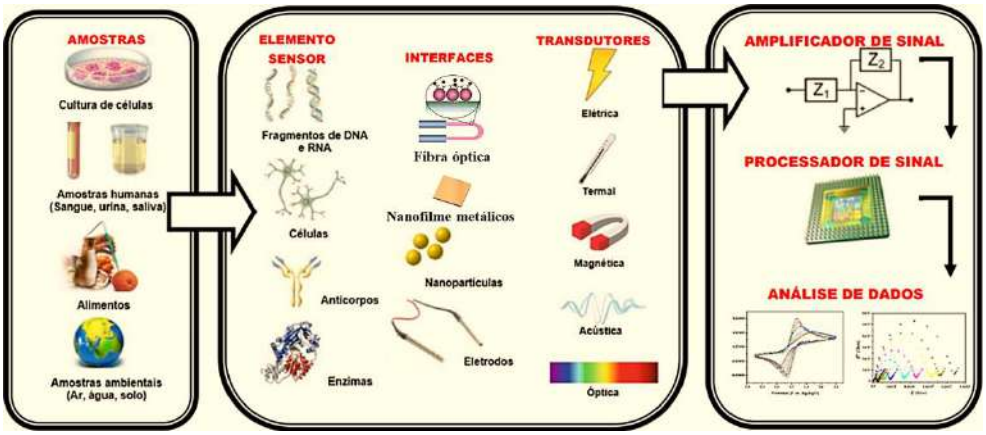


Figura 6 – Componentes típicos de um nanossensor. Fonte: Adaptado de [67-69].

Como apresentado na Figura 6, a amostra ou analito entra em contato com o elemento de reconhecimento podendo ser um anticorpo, células, enzimas, fragmentos do ácido desoxirribonucleicos (DNA) ou do ácido ribonucleico (RNA) e que provocam mudanças físico-química (que podem ser ópticas, térmicas, magnéticas, acústicas ou elétricas). A interface (fibras ópticas, nanopartículas, eletrodos ou nanofilmes) atua como um transdutor, onde processa e converte esse sinal físico-químico em um sinal mensurável.

Na etapa seguinte, a unidade processadora de sinal irá amplificar o sinal e transferi-lo para um monitor ou dispositivo, onde a visualização de dados informará ao usuário se o analito foi ou não identificado e/ou a sua concentração na amostra [71, 72].

Os nanossensores baseados em LSPR e SPR são sistemas em ampla expansão que aproveitam as propriedades únicas dos nanomateriais de metais nobres como transdutores. Esses sistemas, apresentam inúmeras vantagens, entre elas: estrutura facilmente adaptável, portátil e custo mais baixo em termos de fabricação de sensores.

A construção dos nanossensores, geralmente é direcionada para a detecção biológica, recebendo, portanto, a denominação de nanobiossensores. Um nanobiossensor foi reportado por SUTHANTHIRARAJ, *et al*., (2019) [73] para a detecção de antígeno do vírus da dengue, com capacidade para detecção de 0,06 µg/mL da proteína do vírus. SAMAVATI, *et al*., (2020) [74] desenvolveram um sistema para diagnóstico da COVID- 19 em saliva de indivíduo sadios, em estágio inicial e avançado da doença. O nanobiossensor desenvolvido por eles foi capaz de diagnosticar amostras de pacientes sadios, em estágio inicial de infecção com concentração de vírus de $1{,}6 \times 10^3$ cópias/mL, apresentando desvios de comprimento de onda e variação de amplitude de: 0,39 nm e 0,48 dB e na fase hiperinflamatória da doença com concentração de vírus de $1{,}2 \times 10^8$ cópias/mL, como sendo de: 0,92 nm e 1,68 dB.

LUZ, *et al*., (2015) [75] desenvolveram um sistema usando uma camada de nanofilme de ouro funcionalizada com antígenos da *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi)* para detecção de anticorpos anti-*T.cruzi* em soro humano. O nanobiossensor permitiu uma detecção qualitativa, simples, eficaz, rápida e específica de anticorpos *anti- T. cruzi.*

No que se refere à detecção biológica com o uso da nanotecnologia, outros trabalhos foram encontrados e estão listados de forma resumida na Tabela 1.

Tabela 1 – Referências de nanobiossensores testados na detecção biológica.

Nanomaterial	**Detecção**	**Limite de detecção (UFC/mL) ***
Nanobastões de ouro	*E. coli O157:H7*	5×10^4 [76]
Nanopartículas de ouro	*Escherichia coli B40*	10^8 [77]
	Salmonella typhimurium	10^4 [78]
		$1{,}1 \times 10^2$ [79]
		10^3 [80]
		10^4 [81]
Nanofilme de ouro	*Escherichia coli K12*	10^4 [82]

*UFC/mL- Unidade formadora de colônias por mililitros

3.3 FUNDAMENTOS DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA

Para explicar os fundamentos dos nanobiossensores por SPR e LSPR, é necessário compreender o conceito básico de plásmons, plásmons de superfície e plásmons de superfície localizados, que serão detalhados a seguir.

Os plásmons estão inseridos nas áreas da fotônica que estuda a interação do campo eletromagnético e dos elétrons livres na interface entre um dielétrico e um metal. O componente importante do material dielétrico é o metal, e é nele que ocorre a propagação de plásmons de superfície (SP) [83]. Isso acontece, principalmente porque os metais estão ligados por retículos cristalinos, sendo que cada átomo fica circundado por 8 ou 12 outros átomos do mesmo elemento metálico, tendo, portanto, atrações iguais em todas as direções. Visto que os átomos dos metais possuem entre 1 e 3 elétrons na última camada eletrônica ou camada de valência e esta se encontra afastada do núcleo, os elétrons escapam facilmente e transitam livremente pelo reticulado, ilustrado na Figura 7.

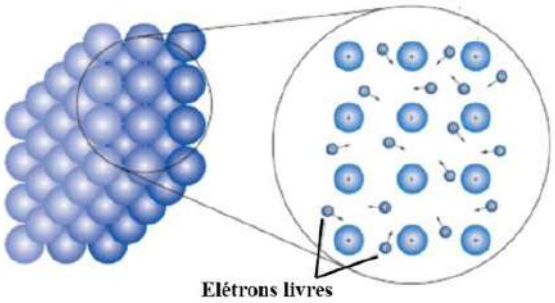


Figura 7 - Representação do arranjo tridimensional regular da superfície de um metal cercada por uma nuvem de elétrons. Fonte: Adaptado de [84].

Um plásmon 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: plásmons de superfície.

Quando a interação da luz ocorre na superfície de uma nanopartícula metálica e esta entra em ressonância, é chamada de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) [35]. O termo localizado se refere ao confinamento do plásmon na superfície da nanopartícula que apresenta tamanho comparável ou menor que o comprimento de onda da luz usada para excitar este plásmon.

Esses efeitos permitem que nanofilmes e NPs possam ser usados não somente como transdutores ópticos, mas também como amplificadores de sinal em função do IR do meio e suportes para detectar e quantificar analitos químicos ou biológicos por meio do monitoramento de mudanças nos espectros de absorbância [51].

Os metais tipicamente empregados para produzir plásmons de superfície são o ouro,

a prata e o cobre. Apesar da prata exibir bandas de plásmons de superfície mais estreito e intenso do que o ouro, a maior estabilidade química das nanoestruturas de ouro favoreceu sua aplicação preferencial como nanobiossensor [12]. Também apresentam como vantagem a sua sensibilidade às mudanças de IR pela maior área superficial e assim uma elevada energia superficial [85] e apresentam pico máximos de absorção da luz na faixa do UV-Vis.

3.3.1 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR)

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

Nos últimos 20 anos, com o aprimoramento das técnicas de caracterização a nível atômico, o desenvolvimento de nanobiossensores 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 8.

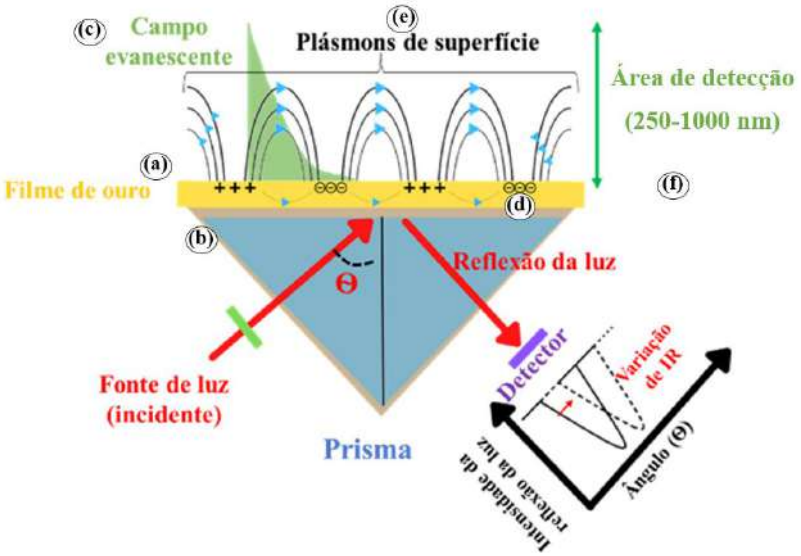


Figura 8 – Sensoriamento por SPR - Configuração de *Kretschmann* onde são mostrados os campos eletromagnéticos formados pela SPR; (a) Analito; (b) Superfície do prisma; (c) Campo evanescente; (d) Oscilação dos elétrons; (e) Plásmons de superfície; (f) Alcance do campo evanescente. Fonte: Adaptado de [86-87].

Nesta configuração presente na Figura 8, os dois meios transparentes são o meio onde se encontra o analito (Figura 8.a) e o da superficie do prisma (Figura 8.b). Também, o IR do meio dielétrico por onde a luz incidente se propaga deve ser maior do que a do meio dielétrico do analito. Nessa condição, é gerado um campo evanescente (Figura 8.c) perpendicular à interface metal-dielétrico, que é responsável por excitar os eletróns livres,

resultando em sua oscilação. Esta oscilação faz com que por períodos muito curtos de tempo, esses elétrons se acumulam em um lado da superfície da rede atômica (Figura 8.d) com uma frequência de oscilação, que denominamos de plásmons de superfície (Figura 8.e). Caso esta frequência de oscilação dos elétrons ou plásmons se iguale à frequência da radiação eletromagnética incidente chega-se à condição de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) [46, 66] se propagando sobre a superfície até sua decomposição, seja por absorção ou por transição radiativa em um fóton [88].

Como nanossensor, o efeito de SPR possui um campo evanescente com um alcance entre 250 a 1000 nm (Figura 8.f), apresentando portanto uma maior sensibilidade às variações do IR do meio em relação ao LSPR [89]. Uma representação do alcance do campo evanescente dos plásmons são vistos na Figura 9.

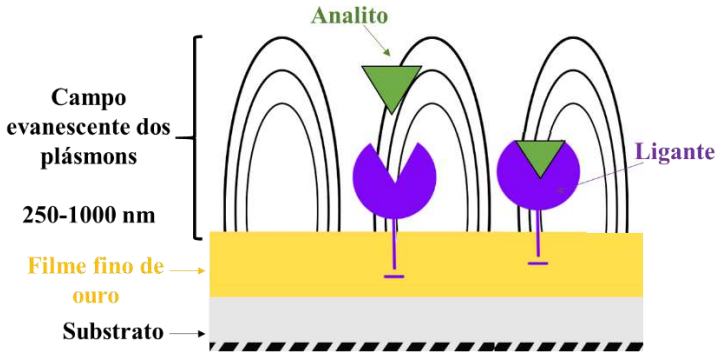


Figura 9 - Alcance do campo evanescente de um nanofilme. Fonte: Adaptado de [90].

Com um alcance maior do campo evanescente, a técnica por SPR é mais suscetível as variações ocorridas na amostra a ser analisada, o que significa maior sensibilidade na detecção de variações promovidas por partículas menores que a faixa de alcance do seu campo evanescente [90]. Por sua vez, aplicações com o efeito da SPR permitem detectar contaminantes de caráter ácido-base, bactérias, moléculas, além de maior resistência às variações de temperatura e pH.

O fenômeno de SPR é fortemente dependente da espessura do filme, do tipo de metal, do comprimento de onda da luz, do ângulo de incidência [91], do IR do meio, podendo ser detectados por modulação de frequência, ângulo ou modulação de intensidade [88, 92].

A instrumentação optoeletrônica necessária para excitar os plásmons consiste, basicamente, em uma fonte de luz e uma interface entre os dois meios (como um prisma ou uma fibra óptica), opticamente densos que é coberta com um nanofilme metálico de espessura menor que o comprimento de onda da luz incidente [93]. Esta estrutura permite a aplicação do fenômeno do SPR como sensoriamento devido à sua sensibilidade à

variação do IR do meio, por permitir medições diretas em tempo real e por analisar amostras complexas sem prévia purificação [61].

3.3.2 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA

A Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres confinados na superfície das nanopartículas e não em um filme contínuo como no SPR [34, 94, 95]. Com isso, o efeito da ressonância ocorre independentemente do ângulo de incidência da luz. Na Figura 10, é mostrado o efeito da incidência da luz sobre a superfície de NPs esféricas.

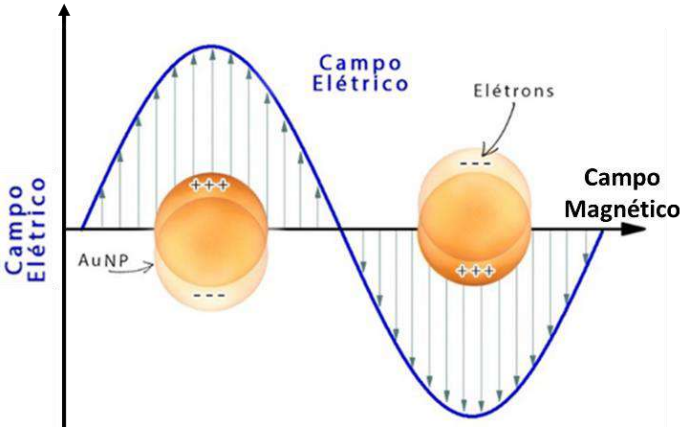


Figura 10 – Exemplificação da LSPR, resultante da oscilação coletivas de elétrons em resposta a um campo elétrico externo. Fonte: Adaptado de [36, 96].

Na Figura 10, quando a luz incide sobre a superfície da nanopartícula, o campo elétrico oscilante faz com que os elétrons livres oscilem. Quando a nuvem de elétrons é deslocada em relação à sua posição original, uma força restauradora faz com que esses elétrons oscilem gerando o LSPR. Esta frequência de oscilação é altamente dependente da composição do metal, distância interpartículas [36], tamanho, da exposição a luz, forma, da natureza do meio local circundante e do IR local [97], visto que esses fatores afetam a densidade de carga na superfície da nanopartícula [98].

Dentre as geometrias das NPs, as esféricas podem ser mais vantajosas para uso como nanobiossensores por LSPR, pois, devido a sua morfologia e revestimento, pode permitir uma imobilização mais direcionada. Além disso, partículas menores produzem campos eletromagnéticos mais confinados, por isso são mais sensíveis a moléculas individuais e/ou menores, que ocupam uma porção maior de sua região de detecção [99], como podem ser vistos na Figura 11.

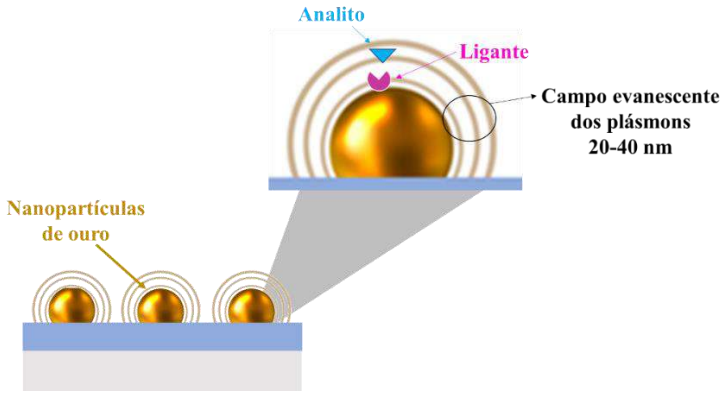


Figura 11 – Alcance do campo evanescente das nanopartículas. Fonte: Adaptado de [90].

Na Figura 11, o campo evanescente dos plásmons das nanopartículas apresenta um alcance de aproximadamente 20 a 40 nm [90]. Desta forma, em uma amostra a ser analisada, o nanobiossensor por LSPR será menos suscetível a variações de IR da amostra e mais suscetível a variações promovidas pela imunocaptura, ou seja, a interação entre o anticorpo e o antígeno de interesse presente no meio. Isso significa menos interferência de sinais, pois outras moléculas ou biomoléculas que estiverem presentes nas amostras serão invisíveis para o sensor [100]. Portanto este tipo de sistema é recomendado para a detecção de moléculas que estejam compreendidas na faixa do alcance do campo evanescente como os antígenos/anticorpos do parasita *T. solium*.

A LSPR apresenta como vantagem em relação ao SPR, a possibilidade de funcionar com um sistema óptico mais simples, serem menos sensível às alterações do IR do meio, a possibilidade de serem usados em circuito integrado (chips), entre outros.

3.4 FIBRA ÓPTICA PLÁSTICA

A fibra óptica plástica (POF) é um filamento flexível, transparente, leve e facilmente moldável. Essas fibras são formadas por um núcleo de polimetilmetacrilato (PMMA) [101] com 980 µm de diâmetro e IR de 1,492, envolvido por uma casca de polímero fluoretado com 20 µm de espessura e 1,402 de IR para uma fibra de 1000 µm de diâmetro, como mostrado na Figura 12.

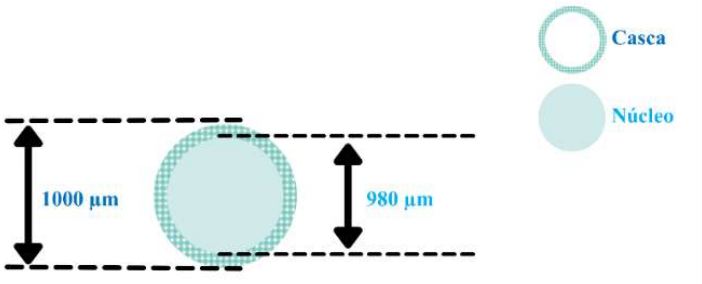


Figura 12 - Seção transversal da POF. Em destaque observa-se o interior da POF composto pelo núcleo de PMMA e revestimento de polímero fluoretado.

Essas fibras ópticas têm ganhado destaque como transdutores ópticos para medir as respostas à iluminação ou à emissão de luz [70] em função da variação do índice de refração do meio [102, 103].

Embora POFs apresentem limite máximo de temperatura operacional entre -55 °C a 70 °C [101] possuem diversas vantagens tais como: capacidade de monitorização remota [104], tamanho compacto [105], moldáveis [106], descartabilidade [70], leve, imunes à interferência eletromagnética [107], são inertes a uma gama considerável de agentes químicos e biológicos [102], flexibilidade, resistência mecânica [108] facilidade de conexão [109]. Também, permite o sensoriamento pontual ou distribuído, apresentam e podem ser combinados com a nanotecnologia [105] para a detecção biológica, diagnóstico, monitoramento da água, dos alimentos e de sistemas.

As fibras ópticas plásticas podem ser do tipo monomodo, suportando apenas um único modo de propagação em todo o seu comprimento [110], ou multimodo, com capacidade para a propagação de luz em diversos modos, como mostrados na Figura 13.

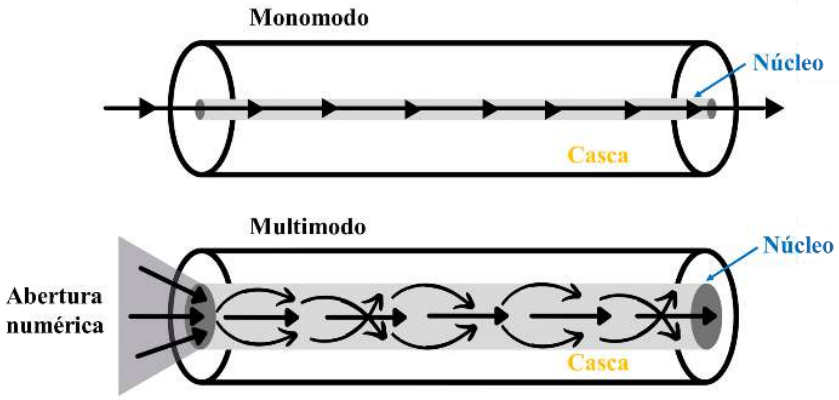


Figura 13 - Mecanismo de propagação da luz nas fibras monomodo e multimodo. Fonte: Adaptado de [111].

As fibras do tipo monomodo apresentam o diâmetro do núcleo pequeno e na mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da luz que passa através dele. Este tipo de fibra apresenta como vantagem a transmissão de informações a longas distâncias, com menor perda de luz comparada às fibras multimodo.

As fibras do tipo multimodo apresentam grande abertura numérica, o que permite transmitir a luz em diversos modos de propagação e o uso de diodos emissores de luz (LEDs) como fonte de luz de baixo custo, facilitando o alinhamento e as emendas de conexões [112]. Por este motivo, podem ser usados sensores ópticos quando a distância percorrida pela luz for menor que 1 metro [113].

3.4.1 PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DA POF

O princípio de transmissão da luz em fibras ópticas ocorre por reflexão interna total (TIR, do inglês *Total Internal Refletion*) em função da diferença de IR entre o núcleo e a casca. O núcleo (n_1) possui sempre um IR maior que o da casca (n_2), característica esta que dependendo do ângulo de incidência do feixe de luz possibilita o fenômeno da TIR e evita a perda de luz para o meio externo [114, 115].

Para que a luz seja guiada no interior da fibra óptica, ela deve atingir a interface entre o núcleo e a casca com um ângulo θ_1 maior que o ângulo crítico θ_c, e este último pode ser obtido de acordo com Equação (1).

$$\text{sen}\ \theta_c = \left(\frac{n_{1\text{núcleo}}}{n_{2\text{casca}}}\right) \qquad \textit{Equação (1)}$$

Onde, θ_c é o ângulo crítico, n_1 o IR do núcleo da fibra óptica e n_2 o IR da casca. Portanto, de acordo com a Equação 1 existe uma relação limite para que ocorra a refração, ou seja, se a luz incidente apresentar um ângulo maior que o ângulo crítico θ_c o raio incidente será refratado (Figura 14.a) ou se propagará paralelamente à superfície entre os dois meios dielétricos [116], como podem ser vistos na Figura 14.b. Mas, como mencionado anteriormente, se o ângulo de incidência for maior que o ângulo crítico θ_c este será refletido novamente para o núcleo da fibra, e assim teremos a transmissão da luz no interior da fibra óptica, como vistos na Figura 14.c

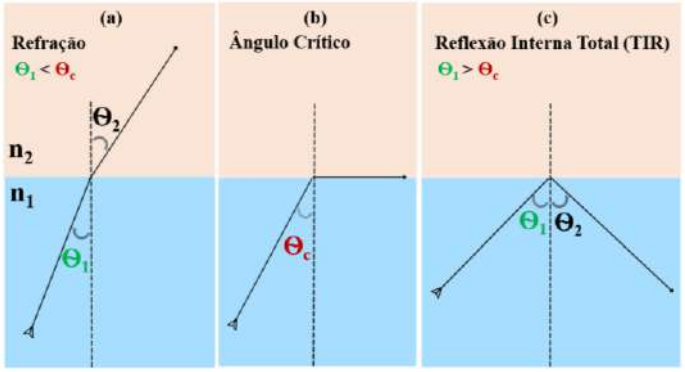


Figura 14 –Reflexão de feixes de luz em uma interface de dois meios dielétricos em diferentes ângulos; (a) refração, (b) ângulo crítico e (c) reflexão interna total. Fonte: Adaptado de [115].

3.4.2 CAMPO EVANESCENTE

Quando a luz é guiada no interior da fibra óptica e esta sofre TIR, uma pequena parte da energia da luz (campo eletromagnético) penetra na casca recebendo a denominação de campo ou onda evanescente, como destacado na Figura 15.

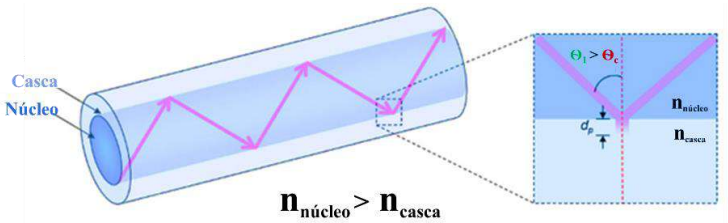


Figura 15 - Campo evanescente gerado pela TIR na interface núcleo-casca se propaga para o interior da casca. Fonte: Adaptado de [117].

Quando o campo evanescente é exposto ao meio externo através da curvatura da fibra ou da exposição do núcleo pela remoção da casca com o uso de solventes, gravura química, polimento lateral ou ablação a *laser* [117], é possível utilizar a fibra óptica como elemento sensor. Neste caso, na região onde ocorre a TIR é gerado um campo eletromagnético que se estende para o meio de menor IR (casca) com alcance de aproximadamente metade do comprimento de onda da luz incidente [94, 107, 117]. Este efeito é definido como profundidade de penetração d_p e está relacionado com a distância das moléculas presentes na amostra, cujo efeito é discernível no campo evanescente [118] aplicando a Equação (2).

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n_{núcleo}^2\, sen^2\Theta_1 - n_{casca}^2}} \qquad \text{Equação (2)}$$

Conforme apresentado na Equação 2, o comprimento de onda da luz (λ), a proporção dos índices de refração $n_{núcleo}$ *e* n_{casca} e o ângulo da luz Θ_1 na interface são quem determinam a profundidade de penetração d_p, e esta pode variar entre 50 a 1000 nm. Portanto, as reações que ocorrem perto da interface perturbam o campo evanescente e, portanto, as mudanças no sinal podem ser calibradas em função da concentração do analito de interesse [119].

O alcance do campo evanescente, ou d_P, é muito pequeno em uma fibra óptica reta, mas pode ser aumentado expondo o campo evanescente da fibra através da remoção da casca, por meio do afinamento da fibra ou da curvatura. Alguns exemplos dessas técnicas são vistos na Figura 16.

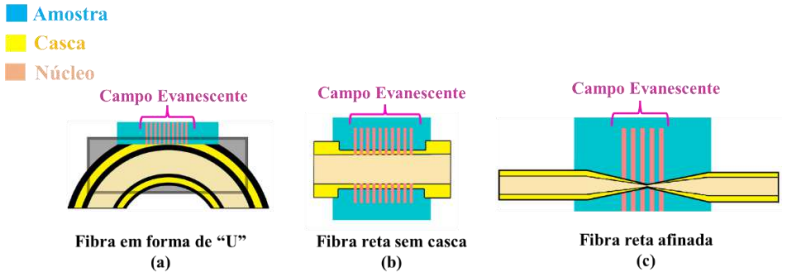


Figura 16 – Exemplos de técnicas para exposição do campo evanescente de uma POF para uso como sensor: (a) afinamento; (b) remoção da casca; (c) curvatura com polimento. Fonte: Adaptado de [120].

Uma vez exposto o campo evanescente, a luz que se propaga na fibra vai ser mais ou menos atenuada de acordo com a concentração da amostra [121]. Por meio deste princípio as fibras ópticas podem ser usadas como sensores [118].

3.4.3 SENSORES POF EM FORMA DE ‘U”

As fibras ópticas, em sua maioria, são desenvolvidas para aplicações em telecomunicação, entretanto, quando curvamos essas fibras alteramos o modo e o ângulo com que a luz se propaga de tal forma que os modos de propagação de ordem superior incidam com ângulo menor que o crítico e escapem para o meio externo [122]. Esta perda de luz em função da curvatura é denominada de perda de luz por refração, e são vistos na Figura 17.



Figura 17 – Exemplo da luz escapando da curva de um sensor a fibra óptica plástica em forma de “U”.

Contudo, os modos de propagação de ordem inferiores são mantidos confinados no núcleo, e mesmo na curva se propagam por TIR, resultando na perda de luz por absorção do campo evanescente pelo meio externo [123]. Um esboço do funcionamento do sensor em forma de “U” é apresentado na Figura 18.

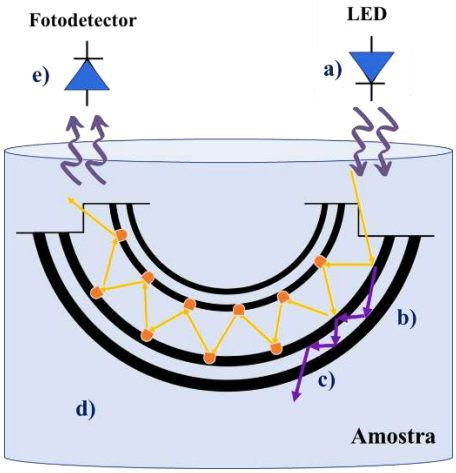


Figura 18 – Princípio de funcionamento do sensor em “U” por perda por refração na curva.

Na Figura 18 uma fonte de luz é acoplada à extremidade da fibra (Figura 18.a) fazendo os modos de propagação de ordem superior incidam na interface núcleo-casca com ângulo menor que o ângulo crítico. Assim, parte da luz é transferida para a casca por refração

(Figura 18.b). O mesmo fenômeno pode acontecer na casca, onde parte da luz é transferida para o meio externo por refração e parte permanece confinada na casca, podendo retornar ao núcleo (Figura 18.c). A luz que é perdida para o meio externo depende da variação do IR em torno da curvatura da fibra (Figura 18.d). Esta perda de intensidade luminosa em função do IR do meio é detectada por um fotodetector localizado na outra extremidade da fibra (Figura 18.e) potencializando seu uso como dispositivo de sensor óptico.

Em um sensor POF em forma de "U" revestido com nanofilme de ouro, a SPR consiste na propagação dos modos de ordem superior que excitam os plásmons do nanofilme. Considerando uma distribuição gaussiana dos modos de propagação, os modos de ordem superiores existem em menor quantidade. Contudo, a curvatura do sensor em forma de "U" contribui para aumentar esse número, fazendo com que um único feixe de luz incida diversas vezes na superfície do nanofilme, ampliando o fenômeno de ressonância [119]. Para cada IR do meio existirá um ângulo de absorção específico que será absorvido pela ressonância dos plásmons, com isso, mais ou menos luz será absorvida [123]. O resultado desta absorção dependente do ângulo de incidência da luz, e pode ser detectado por um fotodiodo.

O uso da POF como sensor por SPR está condicionada à exposição do campo evanescente da POF, à forma de remoção da casca e ao processo de deposição do nanofilme. Além disso, o processo de fabricação influenciará na estabilidade, repetibilidade e facilidade de fabricação [92].

3.5 NANOFILME DE OURO

Os nanofilmes de ouro podem ser produzidos em várias espessuras e por técnicas como por: Deposição Física de Vapor (PVD) que pode ser por evaporação ou por pulverização catódica (*sputtering*) e pela Deposição por Laser Pulsado (PLD) que consiste em uma técnica que usa pulsos de energia de *laser* para remover o material da superfície de um alvo e fixar em um substrato.

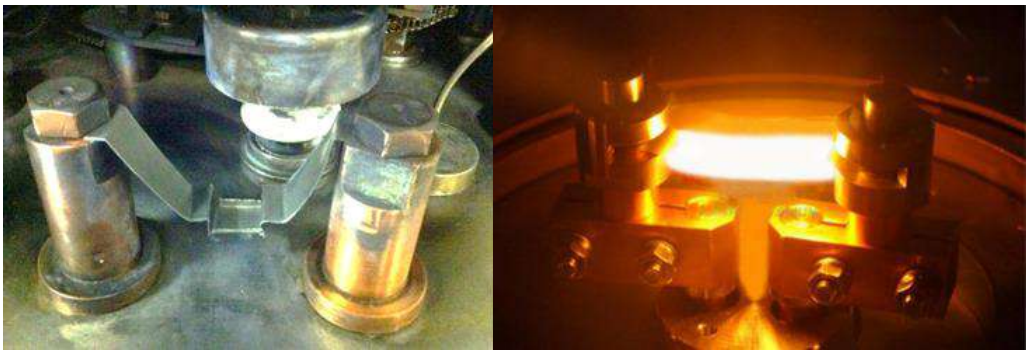
A deposição por *laser* pulsado consiste no uso de um laser com alta energia para derreter, vaporizar e ionizar o material da superfície de um alvo, formando uma pluma de plasma [124]. Em seguida esta pluma expande e condensa rapidamente em um substrato, sobre o qual forma um filme [125, 126]. A câmara do Sputtering onde ocorre a é apresentada na Figura 19.



Figura 19 – Câmara do *Sputtering* onde ocorre a deposição por *laser* pulsado. Em destaque a formação de uma pluma azul na superfície do alvo.

Os parâmetros de energia do *laser* devem ser ajustados segundo o tipo de amostra e característica do filme a ser formado. Além disso, a distância entre a amostra e o substrato, bem como a característica do gás presente na câmara de deposição são fatores importantes na determinação da velocidade da pluma [124].

Na técnica de PVD por evaporação, a amostra a ser depositada é colocada sobre um cadinho ou barquinha (Figura 20.a) onde é aquecida até a fase de vapor (Figura 20.b), seguida do transporte até a superfície de um substrato, onde condensa formando um nanofilme.



(a) (b)

Figura 20 - Câmara do evaporador onde ocorre a deposição de um filme metálico sobre um substrato de vidro por evaporação. Em destaque: (a) barquinha usado como suporte da amostra a ser evaporada; (b) barquinha e amostra em aquecimento. Fonte: Adaptado de [109].

Esta técnica apresenta como desvantagem a dificuldade de baixo controlar a espessura do filme, o elevado grau de contaminação, não permite a evaporação de metais refratários e de difícil controle na produção de nanofilmes compostos.

A pulverização catódica por *sputtering* é um processo pelo qual átomos ou moléculas de um material são ejetados de um alvo pelo bombardeio de partículas de alta energia [127]. Neste processo, ocorre a colisão de partículas incidentes de gás argônio com partículas da superfície do alvo (Figura 21.a) e que, por sua vez colidem com outros átomos do alvo para formar um processo em cascata (Figura 21.b). Neste processo, certos átomos-alvo próximos à superfície ganham impulso suficiente para serem expelidos para

fora do alvo e serem direcionados para o substrato (Figura 21.c). Durante a deposição um campo magnético é formado na superfície do cátodo alvo que faz aumentar a taxa de pulverização catódica sobre a superfície do substrato (Figura 21.d) [128, 129]. Na Figura 21 é apresentado um esquema da pulverização catódica dentro de uma camara de *sputtering.*

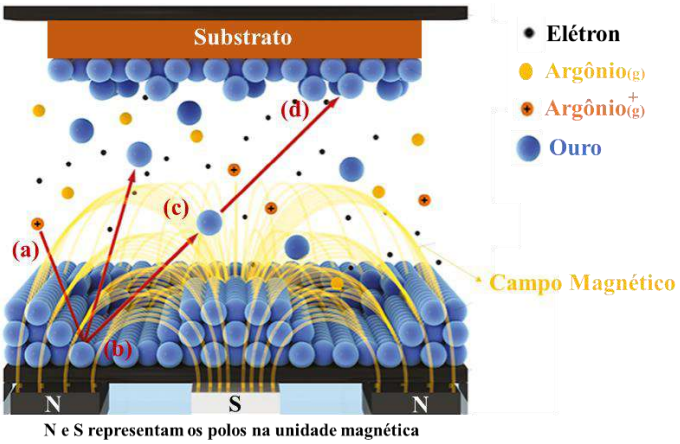


Figura 21-Representação da pulverização na câmara de um s*puttering* onde ocorre a pulverização catódica. Em destaque: (a) átomo de argônio; (b) alvo de ouro; (c) átomos de ouro; (d) nanopartículas de ouro. Fonte: Adaptado de [130].

Este sistema de deposição apresenta várias vantagens pois permite obter: taxas de deposição elevadas, facilidade de pulverização catódica de qualquer metal, liga ou composto fabricar filmes com alta pureza, adesão extremamente alta dos filmes, excelente cobertura e capacidade de revestir substratos sensíveis ao calor (incluindo fibras ópticas plásticas) [129].

3.6 IMOBILIZAÇÃO DE NANOFILMES DE OURO

Assim como na funcionalização, a imobilização confere compatibilidade biológica, seletividade ao nanobiossensor por SPR via adsorção química, com a formação de ligações covalentes na superfície do nanofilme de ouro [131].

A imobilização é determinada pela natureza química da biomolécula a ser imobilizada, o tipo de elemento transdutor usado e as propriedades físicas do analito que são preponderantes para a escolha e elaboração de um protocolo [70].

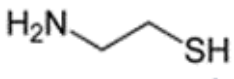
A abordagem mais comum para a imobilização dos nanofilmes de ouro (Film-Au) consiste em três etapas: adição de grupos amina na superfície do nanofilme, ativação do agente biológico (anticorpo, enzima, proteínas entre outros) e bioconjugação.

A primeira etapa consiste no uso de ligantes contendo um radical tiolado que são adsorvidos espontaneamente na superfície do nanofilme para formar uma matriz ordenada

[132, 133]. Esta reação química de ligação entre o tiol e o ouro é descrita por meio da formação de um radical tiolato (Au-SR), um processo em equilíbrio químico com desprotonação da molécula de tiol seguida da eliminação da molécula de hidrogênio (H_2) da superfície do metal [132].

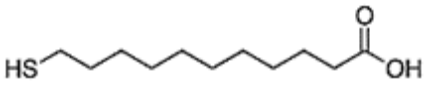
As principais moléculas tioladas empregadas são apresentadas na Figura 22.

(a)



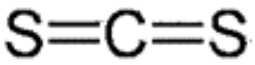
Cisteamina

(b)



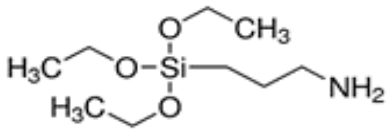
Ácido mercaptoundecanóico (MUA)

(c)



Dissulfeto de carbono

(d)



3-Aminopropil
Trietoxisilane (APTES)

Figura 22 –Reagentes tiolados comumente empregados na imobilização de nanofilmes de ouro; (a) Cisteamina [59, 67, 82]; (b) MUA [134, 136]; (c) dissulfeto de carbono [137]; (d) APTES [138].

Uma vez ligado a superfície do Film-Au, o segundo radical do ligante, geralmente uma amina, se liga ao grupo carboxílico da biomolécula, após prévia ativação. A ativação ocorre com o preparo de uma solução de reticulação produzida com a mistura de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-carbodiimida (EDAC) e N-Hidroxisuccinimida (NHS) [139]. Em seguida, essas biomoléculas ativadas são ancoradas ou bioconjugadas à amina do ligante em mais uma imobilização no final da molécula [74, 136]. Após isso, o nanobiossensor está pronto para ser usado na captura do analito de interesse.

Os ensaios com os nanobiossensores produzidos com o nanofilme apresentam, a depender da espessura, maior aderência à superfície do substrato, maior estabilidade química e podem ser configurados para a medida das variações de IR do meio por modulação de ângulo ou intensidade.

A modulação por ângulo consiste no uso de uma fonte de luz com comprimento de onda fixo e a variação do ângulo de incidência sobre a interface metal-dielétrico é imposta pela variação do IR do meio. O resultado é apresentado conforme ilustrado na Figura 23.a

A modulação em intensidade utiliza um feixe de luz monocromática com ângulo de incidência fixos para excitar os plasmóns [140]. A variação do IR no meio resultará em

variações de intensidade determinada pelo uso de um espectrômetro (Figura 23.b). Este tipo de sensor permite o monitoramento das medidas em tempo real.

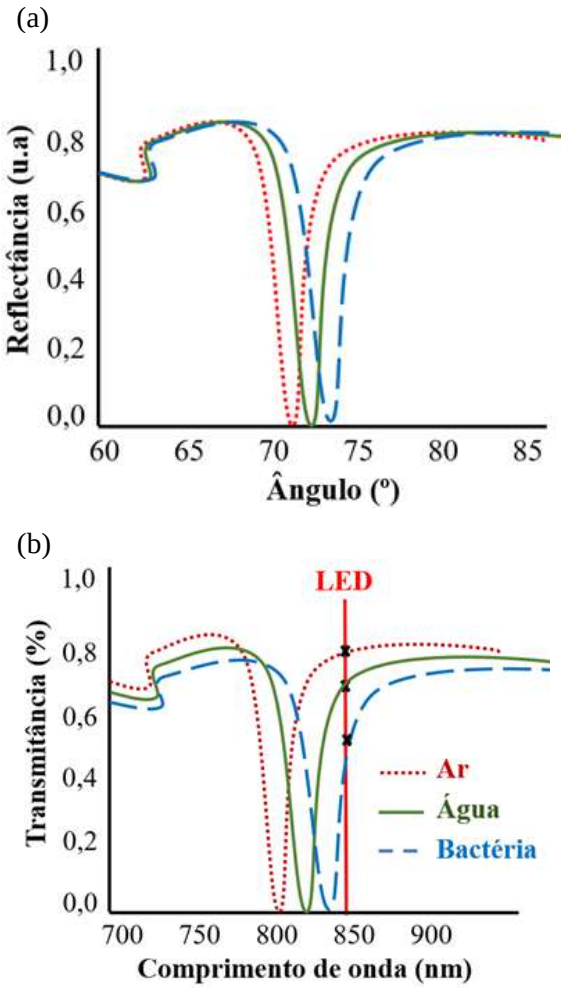


Figura 23 – Esquema de medida por modulação de (a) ângulo e por (b) intensidade da luz, em função da mudança do índice de refração do meio.

3.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNPs)

A síntese de nanopartículas consiste basicamente em duas abordagens de síntese e fabricação conhecidas por *top-dow* e *bottom-up*. A técnica de *top-dow* ou "de cima para baixo" envolve a construção de nanoestruturas, a partir de materiais em macroescala, como o uso da moagem ou do atrito, por exemplo [45]. Por sua vez, o método *bottom-up* ou "de baixo para cima" é o mais empregado e consiste na construção átomo por átomo ou molécula por molécula para formarem estruturas em nanoescala, como acontece na síntese química [141].

A escolha do método de síntese depende da sua aplicação e da característica final do nanomaterial, que influenciará na escolha adequada dos revestimentos para a passivação da superfície das NPs.

Os agentes de passivação ou estabilização mais comuns incluem, citrato, surfactantes, tióis, sílica e polímeros. As principais diferenças entre esses revestimentos empregados na síntese das AuNPs em função do tipo de aplicação são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Principais características dos revestimentos empregados na síntese das NPs. Fonte: adaptado de [50, 142].

	Citrato de sódio	**Brometo de cetiltirmetilamônio CTAB**	**Polietilenoglicol PEG**	**Sílica**	**Polivinilpirrolidona PVP**
Capacidade de modificar a superfície	Muito Fácil	Fácil	Difícil	Moderada	Fácil
Força de ligação à Superfície das AuNPs	Baixo	Moderado	Muito forte	Muito forte	Moderado
Estabilidade ao calor	Boa	Excelente	Baixa	Boa	Não especificado
Potencial Zeta	< -15 mV	> +30 mV	±5 mV	< -30 mV	Não especificado
Quando utilizar este revestimento	Planejando outras modificações	Planejando outras modificações	Aplicações *in vivo* ou *in vitro*	Planejando outras modificações	Planejando outras modificações

A escolha do revestimento para a produção de suspensões de AuNPs deve levar em consideração a aplicação, estabilidade, monodisperso para a produção de altas concentrações com menos impurezas provenientes de resíduos químicos do processo de fabricação e que permitam a funcionalização de agentes específicos [50, 57].

Para uso como nanobiossensores, as AuNPs estabilizadas em citrato de sódio, CTAB ou PVP são mais recomendadas, por apresentarem maior facilidade na remoção e/ou substituições desses revestimentos pelas moléculas de interesse. Por outro lado, o revestimento polietilenoglicol (PEG) com sílica tem sido usados no transporte e como nanocarreadores para drogas [143, 144].

3.7.1 SÍNTESE DE AUNPS

Atualmente existem vários métodos de síntese química de suspensões de AuNPs para a obtenção de diferentes formas, tamanhos e estabilidade. O método mais conhecido para a obtenção de AuNPs esféricas foi desenvolvido por *Turkevich, et al.*, (1951) [39]. Este método consiste basicamente em quatro etapas, que são: redução, nucleação, crescimento e estabilização. Um esquema das etapas que antecedem a formação das suspensões de AuNPs é apresentado na Figura 24.

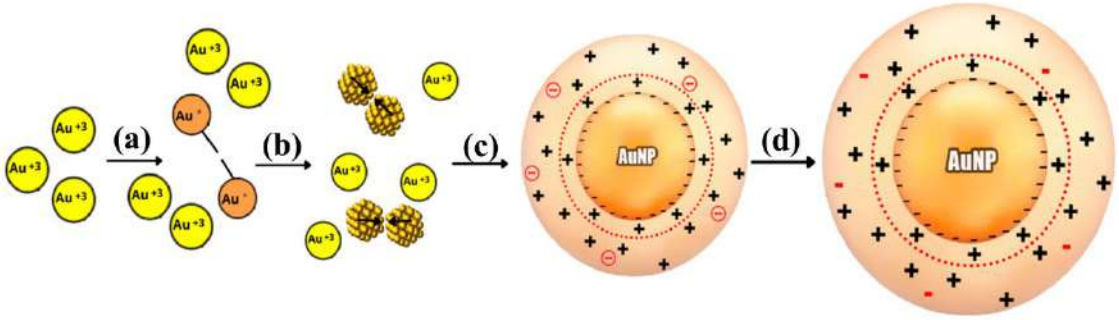


Figura 24 – Processo de formação das NPs que consiste nas etapas de: (a) redução; (b) nucleação; (c) crescimento e (d) estabilização com a formação da NPs. Fonte: Adaptado de [145].

A primeira etapa (Figura 24.a), consiste na redução gradativa do agente precursor de ouro, o tetracloroaurato III ($HAuCl_4$) ou sal de ouro, onde os íons (Au^{+3}) são reduzidos a íons de ouro metálico (Au^0) na presença de uma agente redutor e estabilizante como a solução aquosa de citrato de sódio, sob aquecimento e agitação constantes [146]. Nesta etapa o agente precursor é reduzido e a concentração de átomos de ouro vai aumentando [49] e formando partículas de sementes com diâmetro inferior a 3 nm [147].

Com o tempo as partículas sementes vão coalescendo até formarem um núcleo estável com o aumento gradual do pH [35], esta etapa é conhecida por processo de nucleação (Figura 24.b). Na terceira etapa, os monômeros de ouro gerados crescem em diâmetro no topo das superfícies das partículas de semente até que o (Au^0) seja totalmente consumido [145] (Figura 24.c). A última etapa consiste na estabilização com a formação das AuNPs [141] (Figura 24.d), seguidas pela purificação em centrífuga para remoção de impurezas, do excesso do agente redutor e concentração da suspensão de AuNP [148].

A síntese por *Turkevick* produz NPs com diâmetro entre 10 a 20 nm [149]. Ao variar a concentração de íons de ouro e/ou do agente redutor [38] para a produção de AuNPs maiores que 20 nm por este método, a suspensão apresenta baixo rendimento e NPs polidispersas [149].

Assim sendo, outros métodos de sínteses são estudados, como o da síntese de AuNPs usando a abordagem por semeadura. Este método consiste em duas etapas: a formação das sementes e a de crescimento. Um diagrama das etapas da síntese é mostrado na Figura 25.

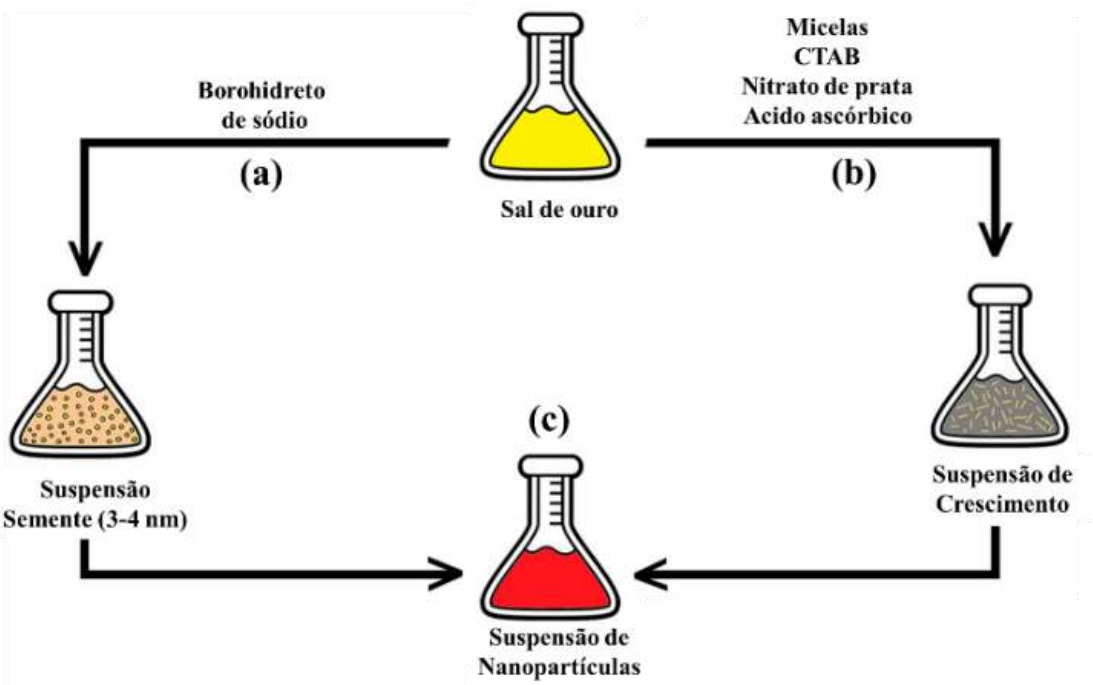


Figura 25 – Diagrama das etapas de síntese de NPs por semeadura; (a) preparo da suspensão semente; (b) preparo da suspensão de crescimento; (c) formação das AuNPs. Fonte: Adaptado de [150, 151].

Na Figura 25, a primeira etapa compreende a formação da semente que consiste na mistura do sal de ouro com o agente redutor borohidreto de sódio (Figura 25.a). Esta mistura produz uma suspensão de AuNPs com diâmetro entre 3 a 4 nm, e tem por objetivo, aumentar a taxa de crescimento e o tamanho das NPs.

A segunda etapa, consiste no preparo da suspensão de crescimento contendo micelas em forma de bastonetes e em presença do estabilizante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), ciclohexano e acetona (para preparo da micela), ácido ascórbico (como agente redutor fraco) e baixa concentração de solução de nitrato de prata para direcionamento da forma e produção de nanoesferas ou nanobastões (Figura 25.b) [150-152]. Após isso, a suspensão semente é misturada a suspensão de crescimento sob constante agitação e aquecimento por pelo menos 20 minutos (Figura 25.c) até que a suspensão mude de cor de um cinza para um rosa. Após isso a suspensão poderá ser purificada e concentrada.

Segundo Jana *et al*., (2001a) [152], a depender da concentração de reagentes e soluções empregadas na síntese, a suspensão de AuNPs por semeadura podem apresentar perda de estabilidade após 24 horas do término. Portanto o ajuste das concentrações deve ser avaliado.

Outras técnicas de síntese de AuNPs por via química são listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Métodos de Síntese de AuNPs.

Métodos de síntese de AuNPs	Agente redutor	Revestimento	Diâmetro
Brust Schiffrin	Borohidreto de sódio	Tiol	2,5 nm [153]
		CTAB	3,4 nm [154]
Síntese verde	Extrato de Hibisco	Extrato de Hibisco	14 nm [2]
	Mel (frutose)	Proteínas presente no mel	15 nm [155]
	Extrato de ameixa *Prunus domestica*	Extrato de ameixa	20 nm [156]
	Extrato de coentro	Extrato de coentro	6,75 - 57,91 nm [157]
Redução química	Ácido ascórbico	Quitosana	18 nm [158]
	Ácido cítrico	Brometo de Cetrimônio	1-22 nm [159]

Na Tabela 3 foram apresentadas publicações envolvendo sínteses químicas de AuNPs empregando diversos agentes redutores e de revestimento que resultam em NPs de diferentes tamanhos. Apesar da síntese de AuNPs existir há algum tempo, suas aplicações dispararam recentemente devido ao avanço das ferramentas analíticas em nanoescala [150, 160].

Recentemente tem despontado vários estudos para a síntese de NPs empregando reagentes biodegradáveis tais como: carboidratos, lipídios, ácidos nucléicos, extratos de frutas entre outros. Esse tipo de síntese é conhecido como síntese verde e tem como finalidade a síntese de AuNPs com baixa toxicidade e serem seguras para o meio ambiente [150]. Entretanto, esse tipo de síntese apresenta baixa eficiência, controle moderado sobre polidispersidade das AuNPs e são demorados [157].

Muitos esforços foram feitos até o momento para explorar várias rotas de sínteses químicas, mas ainda existe a necessidade do estudo e aprimoramento das sínteses de AuNPs para a obtenção de NPs mais estáveis, com maior durabilidade e adequadas para aplicações biomédicas e como nanobiossensores [150].

3.7.2 FUNCIONALIZAÇÃO DE SUSPENSÕES DE AuNPs

A funcionalização confere compatibilidade biológica, especificidade e seletividade ao nanobiossensor pela associação de grupos químicos [38], seja diretamente ou através de modificações na superfície das NPs [46, 91].

Para essas aplicações, as NPs não devem se ligar inespecificamente umas às outras ou a qualquer outra molécula presente no meio que não seja o analito de interesse [161].

Por isso a funcionalização é um processo importante que requer otimização constante [55].

A abordagem mais comum para a funcionalização das AuNPs consiste em três etapas: aminação (AuNPs-Cys), ativação do anticorpo (Ac) (ou outra molécula de interesse) e conjugação da suspensão aminada com o anticorpo (Ac).

A aminação consiste na substituição da camada de revestimento presente na superfície das AuNPs por uma molécula contendo um radical tiol (-SH) e outro amina (NH_2). O tiol possui átomos de enxofre que se ligam covalentemente as AuNPs diminuindo a energia de superfície, os efeitos da agregação e conferindo estabilidade às NPs [46]. O radical amina permite a conjugação com proteínas, anticorpos e outras moléculas biológicas. [142].

Na Figura 26 são apresentadas as principais moléculas tioladas empregadas nesta substituição.

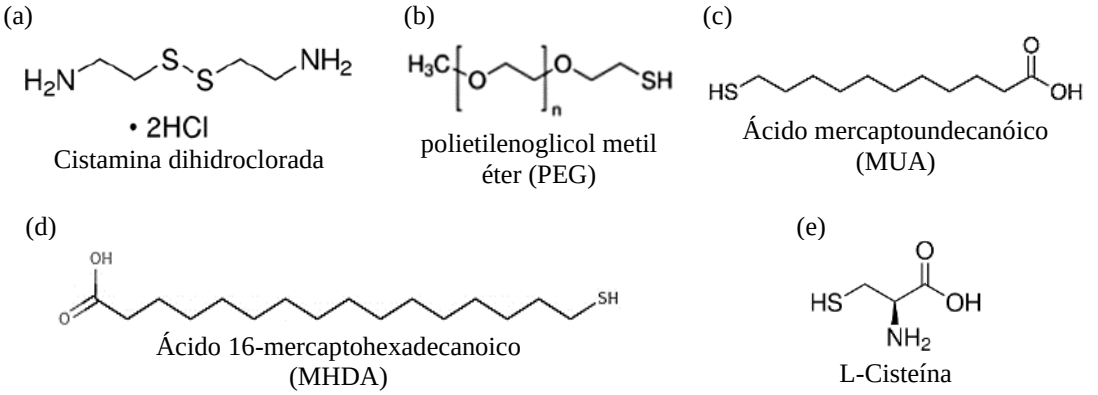


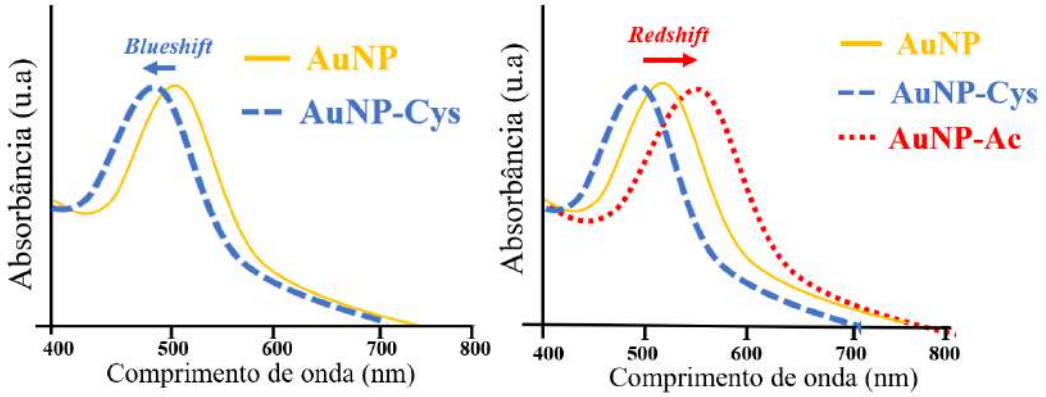
Figura 26 –Reagentes tiolados comumente empregados na substituição do estabilizantes das AuNPs; (a) Cistamina dihidroclorada [162]; (b) PEG [163]; (c) MUA [134]; (d) MHDA [139]; (e) L-Cisteína [67];

A aminação (AuNPs-Cys) reduz a citotoxicidade presentes na suspensão das AuNPs devido à presença de alguns estabilizantes, como o CTAB [164]. Contudo, este procedimento também aumentam as chances de agregação das NPs devido à perda de proteção promovida pela camada do estabilizante. Portanto, neste procedimento o controle estrito das condições experimentais, inclusive da temperatura, é necessário para evitar que as AuNPs se agreguem durante o processo de substituição [58].

Após a aminação, ocorre a ativação dos anticorpos (Ac) para que possam ser acoplado as AuNPs-Cys. Entre os reagentes comumente usados estão o 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e o N-hidroxissulfosuccinimida (Sulfo-NHS) [165-168], empregados na ativação de radicais carboxilas terminais do Ac [169]. Em seguida as suspensões de AuNPs-Cys são conjugadas com os anticorpos ativados,

passando a ser denominadas AuNPs-Ac. Nesta etapa ocorre a formação de ligações químicas na superfície das AuNPs modificadas (AuNPs-Cys) permitindo a fixação ou ancoragem do anticorpo (Ac) [170].

A cada modificação na superfície das AuNPs, e a depender da concentração e do IR do meio, ocorrerem também alterações nas propriedades eletrônicas das NPs e consequentemente alterações espectrais do pico de absorção máxima dos comprimentos de onda [5]. Um exemplo disso é apresentado na Figura 27.



(a) (b)

Figura 27 – Esquema dos deslocamentos espectrais do pico de absorção máxima das AuNPs, AuNPs-Cys e AuNPs-Ac. Em destaque o deslocamento para o comprimento de onda correspondente ao (a) *blueshift*; (b) e a do *redshift;*

As AuNPs apresentam suas superfícies revestidas por estabilizante (CTAB, PVP, entre outros) que são moléculas de alto peso molecular em relação as moléculas do grupo funcional tiolado. À vista disso, o peso molecular e as variações do IR do meio circundante das NPs são reduzidos, resultando no deslocamento do pico de absorbância para o comprimento de onda próximo do azul (*blueshift*) em relação ao espectro da síntese das AuNPs, como podem ser vistos na Figura 27.a.

À medida que ocorre a conjugação das AuNPs-Cys com o Ac, ocorre também o aumento no IR local e como consequência o pico máximo de absorbância é deslocado para o comprimento de onda próximo do vermelho (*redshift*) (Figura 27.b). O mesmo acontecerá quando as AuNPs-Ac forem colocadas em contato com o analito de interesse (antígeno-Ag) [54].

Deste modo, comparar os espectros durante cada etapa da funcionalização e após a detecção do analito podem revelar mudanças espectrais indicativa de interações eletrostática [3]. A essas mudanças espectrais é denominada por Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) e são exploradas no desenvolvimento dos nanobiossensores [5].

3.8 CARACTERIZAÇÃO

3.8.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNPs metálicas possuem propriedades físicas e químicas dependentes do seu tamanho e forma e podem ser caracterizadas empregando várias técnicas, entre elas destacamos a:

- Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis) - é usado para estudar as propriedades ópticas das AuNPs [36] através do efeito da LSPR. Neste efeito, os elétrons livres das NPs vão oscilar em resposta à estimulação luminosa [171] e como resultado apresentarão diferentes espectros de absorbância em função de sua geometria, do IR do meio circulante e de seus ligantes.

- Para estudos morfológicos e da dispersão das NPs, existem diferentes técnicas microscópicas como: o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) que se baseia no princípio de varredura de elétrons e fornece todas as informações disponíveis sobre as NPs. O Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) que se baseia no princípio de transmitância de elétrons, podendo fornecer informações sobre a geometria e sobre duas ou mais camadas da NPs [36].

- O Microscópio de Força Atômica (AFM) - assim como o TEM, permitem a criação de um mapa topográfico de imagens de um átomo ou molécula individual. Esta técnica permite o estudo morfológico da superfície, que podem ser metálicas, semicondutores, poliméricas e outras propriedades como rugosidade, dureza, rigidez, elasticidade, atrito, entre outras [174].

- Para estudar a natureza dos materiais de ligação, tamanhos e estabilidade das dispersões coloidais de AuNPs, o analisador de tamanho Potencial Zeta pode ser usado. Este equipamento indica e quantifica a carga eletrostática superficial das NPs que podem variar no tipo (negativo ou positivo) e na magnitude. Por meio da quantificação da carga superficial é possível calcular o potencial total e determinar se a suspensão coloidal está estável ou não [151]. Na tabela 4 são apresentadas as faixas de medida indicativo da condição de estabilidade da amostra.

Tabela 4. Faixas de estabilidade de sistemas coloidais determinadas pelo Potencial Zeta. Fonte: Adaptado de [174, 175].

Potencial Zeta (mV)	**Comportamento de estabilidade dos coloides**
0 até ± 5	Rápida coagulação
± 10 até ± 30	Baixa estabilidade
± 30 até ± 40	Moderada estabilidade
± 40 até ± 60	Boa estabilidade
> ± 60	Excelente estabilidade

Para que uma dispersão coloidal seja considerada com estabilidade adequada para aplicações em um nanobiossensor, deve apresentar potencial acima de ± 30 milivolts (mV).

3.8.2 NANOFILME DE OURO

Os nanofilmes de ouro podem ser caracterizados aplicando técnicas para a medida de sua espessura, rugosidade e de sua transparência. A medida da espessura e da rugosidade dos filmes pode ser feita usando:

- Perfilômetro de contato – mede a superfície de um nanofilme depositado sobre um substrato, resultando na medida da topografia, rugosidade e degrau. Desta forma é possível estimar uma média da espessura do filme em função das condições de deposição empregadas. Neste caso, também podem ser usado o AFM.
- Refletômetro - instrumento óptico usado para medir espectros de refletância e transmitância e compará-lo a um banco de dados, e assim determinar de forma indireta a espessura de um filme ou o quão reflexivo ele é.

3.9 DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS

Atualmente existem diversos patógenos que são responsáveis por inúmeras mortes anualmente, alguns desses negligenciadas, de difícil e/ou demorado diagnóstico. Deste modo, quanto maior o tempo de detecção ou a não detecção do agente causador de infecções, maiores serão o número de infectados, podendo levar a um surto.

Segundo dados do Ministério da Saúde entre 2007 e 2015, houve um aumento no número de doentes por infecções causadas por bactérias com uma média de 13.717 casos/ano [28, 177]. Desses, as das espécies *E. coli* foram as mais predominantes. Contudo, em relação as infecções causadas pelo parasita *T. solium*, pouco se sabe a respeito, tendo em vista a dificuldade e/ou custos elevados para o um diagnóstico, principalmente em áreas endêmicas.

As infecções causadas pela bactéria *E. coli* e pelo parasita *T. solium* podem ser resultado da falta de saneamento básico e higiene [28], pelo crescimento populacional e urbanização desordenada, contaminação industrial devido às más práticas e necessidade de produção de alimentos em larga escala [178] pela ingestão de alimentos mal cozidos ou *in natura* contaminados, dificuldade de diagnósticos principalmente em áreas endêmicas, entre outros.

3.9.1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é uma espécie de bactéria gram-negativa com cerca de 3 μm de comprimento e 1 μm de espessura em forma de bastonete como apresentado na Figura 28.

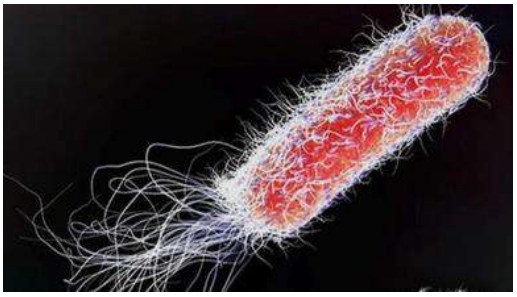


Figura 28 – Imagem da *Escherichia coli*. Fonte: [178].

Seu habitat é o trato-intestinal de humanos e de animais de sangue quente [25], podendo também estar presente no solo, vegetação e na água.

No homem, algumas espécies são responsáveis por metabolizar vitaminas e inibir o desenvolvimento de bactérias prejudiciais à saúde. Contudo, alguns sorotipos como a *E.coli enteropatogênicas* (EEC), são capazes de provocar infecções intestinais como a "diarréia do viajante, ou infecções urinárias que acometem principalmente as mulheres, podendo levar à morte [25].

As rotas mais comuns de contaminação por *E. coli* são o consumo de água, vegetais, carne mal-passada, leite não pasteurizado e contaminados com a bactéria, além de banhos em rios e mares poluídos [178, 179]. Além disso, sua presença no ambiente é indicativa de poluição de origem fecal e, portanto, serve como parâmetro para monitorização da qualidade da água [180].

No Brasil entre 2007 a 2016 as bactérias patogênicas com maior incidência foram as da espécie *E. coli*, seguidos pela *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, como apresentado na Figura 29.

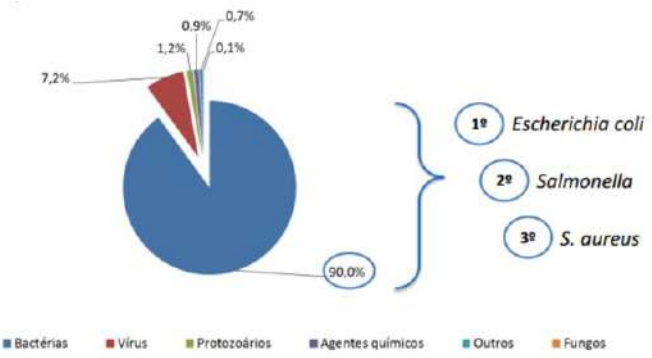


Figura 29 – Perfil epidemiológico do Brasil entre 2007 a 2016. Fonte: Adaptado de [182].

Este grupo de bactérias integram as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), caracterizadas pelos sintomas tais como: diarréia, dor abdominal, febre, náuseas ou vômitos atribuídos à ingestão de água ou alimentos contaminados [28]. Entre as regiões brasileiras com maiores incidência de surtos por DTA, entre 2007 a 2017, estão as regiões sudeste e nordeste, como podem ser vistos no perfil epidemiológico da Figura 30.

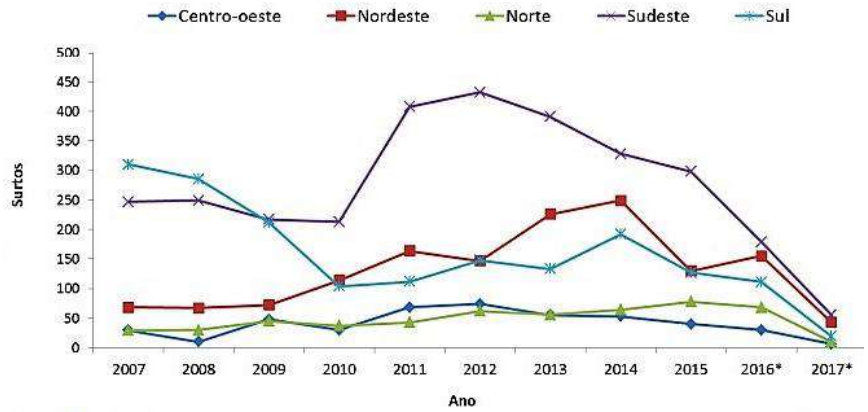


Figura 30 – Perfil epidemiológico do Brasil entre 2007 a 2017, referente a frequência por região dos surtos por DTA. Fonte: [182].

Na região sudeste brasileira, apesar da redução em 2017, ainda é frequente a presença de amostras da bactéria *Escherichia coli* patogênica nos rebanhos bovinos da região fluminense. Isso se deve, a alta incidência da bactéria na água que os animais bebem e no solo dessas regiões [25]. Portanto as ações de prevenção e controle de surtos por essas bactérias baseiam-se, principalmente, na interrupção da cadeia de transmissão e/ou pontos de contaminação, por meio da coleta de amostras para identificação do patógeno responsável pela doença e posteriores medidas de eliminação do foco [28].

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 qualidade e a balneabilidade dos mesmos, reduzindo à exposição dos consumidores e dos banhistas a este microrganismo e consequentemente a infecções produzidos pela bactéria [119].

No Brasil, a regulamentação sobre a qualidade da água é feita através da:

- Portaria e Consolidação GM/MS nº 888, de maio de 2021 que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade [183];

- Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 331, de 23 de dezembro de 2019, que dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação [184];
- Instrução Normativa (IN) n°60, de dezembro de 2019 estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos [185];
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONOMA) n°357, de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências [186].

A RDC 331/2019 e a IN nº 60/2019 obrigam a verificação microbiológica laboratorial como forma de controle da qualidade da água e dos alimentos respectivamente para a segurança da saúde pública, onde são estabelecidos limites de aceitação quantitativa [183]. A RDC estabelece, que a água mineral não deve conter nenhuma bactéria *E. coli* em cinco amostras de 250 mL cada, e para a comercialização de alimentos *in natura*, o limite máximo aceitável é de 10^3 UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por gramas). Já o limite para carnes de aves ou miúdos crus, temperados ou não, refrigerados ou congelados é de 5 x 10^3 UFC/g e para a carnes suína de 10^3 UFC/g e para a balneabilidade um limite máximo de 8 x 10^2 UFC/100 mL.

a) *Escherichia coli*

As etapas que envolvem a transmissão da *E. coli* é mostrado na Figura 31.

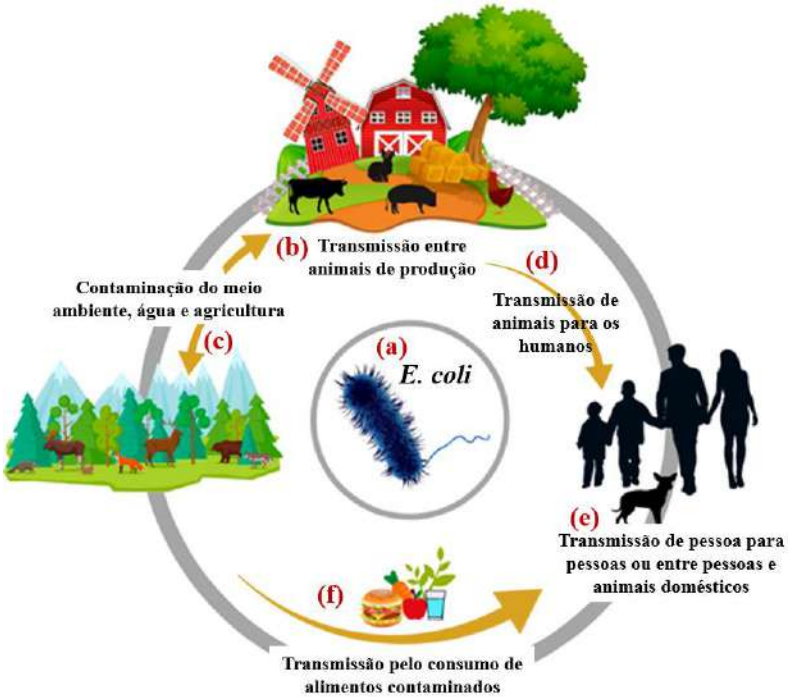


Figura 31 –Esquema de transmissão da bactéria *E. coli.* Fonte: Adaptado de [187].

As bactérias (Figura 31.a) são constantemente eliminadas no meio ambiente pelos animais através das fezes, contaminando os currais, o chão dos animais alojados em ambientes internos (Figura 31.b) e o solo para os animais externos (Figura 31.c). Esta bactéria pode permanecer por até 10 semanas no solo, e se espalham por meio da lama e do estrume em campos e plantações, e nas águas subterrâneas e superficiais [187]. Outras vias de contaminação devido à falta ou baixa execução das boas práticas de higienização, consistem na contaminação cruzada da carcaça que pode ocorrer por uso de equipamentos contaminados e/ou mãos mal higienizadas dos colaboradores, além de ocorrer por meio de fezes do animal no momento do abate ou oriundas do intestino em etapas de processamento da carne [188]. Já a transmissão da *E. coli* a outros animais ocorre por meio de ração contaminada ou da água, e ao homem por contato direto (Figura 31.d.e), ou ingestão de comida (Figura 31.f), água ou de carne contaminada.

b) Diagnóstico

Alguns dos métodos de detecção da *E. coli* são baseados na técnica de tubos múltiplos, em meio de cultura bacteriológico, reação em cadeia da polimerase (PCR), ELISA entre outros. Tais abordagens permitem a detecção e na diferenciação de sorotipos patogênicos de não patogênicos.

A técnica de tubos múltiplos permite a quantificação por "número mais provável" (NMP) de microrganismos e estimar a proporção viável metabolicamente ativa [189]. O procedimento é dividido em duas fases sucessivas, uma presuntiva que requer 48 horas para o teste, seguidos de 48 horas para o teste confirmativo. Nesta técnica são empregados vários tubos de ensaio contendo um tubo de *Durhan* em seu interior, seguidos pela adição de várias concentrações do caldo nutritivo junto com a amostra a ser analisada. Caso a bactéria esteja presente, após 48 horas ocorrerá a formação de gás nos tubos *Durhan*, e os tubos positivos em cada série de diluição são contabilizados e os resultados são comparados com a tabela de *Hoskins* [190]. Após o resultado positivo, são preparados novos tubos contendo o caldo nutritivo específico da *E. coli* para um teste confirmativo. Desta forma, é possível determinar o NMP de células por grama ou mililitros de produto.

O meio de cultura bacteriológico consiste no preparo de meios seletivos, não seletivos e indicadores empregando insumos que fornecem os nutrientes para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos. Em seguida, para o isolamento e enumeração das células bacterianas viáveis presentes nas amostras é realizado as 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 [119, 191].

A Reação em cadeia polimerase (PCR) é outro método de detecção da bactéria, por meio de uma reação de amplificação de um fragmento de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou do ácido ribonucléico (RNA) proveniente de amostras de tecidos, sangue, pele, cabelo, saliva ou bactérias [192]. 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 [193]. Este método apresenta como desvantagem a necessidade de conhecimento sobre sequenciamento genético alvo antes do ensaio e o uso de equipamentos relativamente caros.

Ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um teste sorológico imunoenzimático cuja metodologia se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Este teste de forma geral funciona por meio de uma placa imobilizada com anticorpo ou antígeno específico onde é adicionada a amostra a ser analisada. Se os antígenos ou anticorpos estiverem presentes, ocorrerá a formação de um complexo anticorpo-antígeno ou antígeno-anticorpo e será revelada pela produção de cor com a adição de enzimas marcadoras [193].

Outras técnicas empregadas para avaliação clínica consistem no ELISA e no Ensaio de Imunoeletrotransferência Ligada a Enzima *Blot* (EITB) [21]. O ELISA é um ensaio imunoenzimático comumente usados para detectar anticorpos, antígenos, proteínas e glicoproteínas em amostras biológicas por meio de reações enzimáticas [194, 195]. Esses ensaios podem ser de quatro tipos: direto, indireto, sanduíche e de competição. Um esquema dos elementos envolvidos nas quatro técnicas de detecção por ELISA pode ser visto na Figura 32.

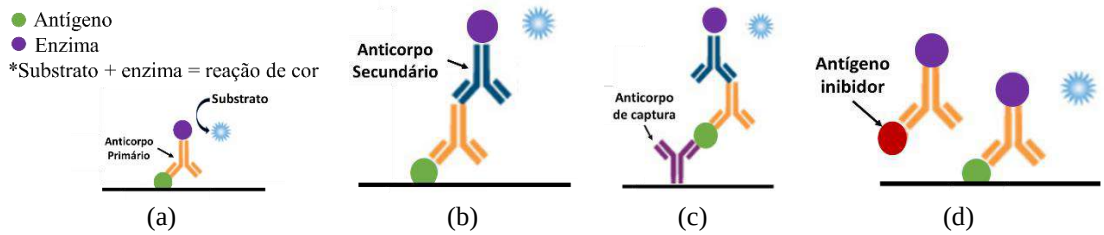


Figura 32 – Esquema dos elementos envolvidos nas técnicas de detecção por ELISA sendo elas: (a) direto; (b) indireto; (c) sanduíche e (d) competição. Fonte: Adaptado de [196].

O ensaio ELISA direto (Figura. 32.a) ocorre o uso do antígeno como molécula alvo,

e este imobilizado em uma microplaca e um anticorpo primário conjugado com uma enzima emissora de cor ou fluorescência. A detecção é realizada medindo a atividade da enzima por meio de incubação com o substrato apropriado para produzir um sinal mensurável [197]. Já o ELISA indireto (Figura. 32.b) é semelhante ao direto, diferenciando no uso de um anticorpo secundário marcado.

No teste de ELISA por sanduíche (Figura. 32.c) o antígeno fica entre dois anticorpos como em um sanduíche e não ligado à microplaca (um suporte). Logo o anticorpo de captura que está imobilizado à microplaca, receberá as amostras contendo o antígeno conhecido ou desconhecido, seguidos pela adição de um anticorpo marcado com uma enzima para a detecção [198].

O teste de ELISA por competição (Figura. 32.d), um antígeno marcado (enzima) é adicionado artificialmente para competir com o alvo (um antígeno sem marcador). Na fase de detecção se o antígeno marcado se ligar menos (baixa alteração de cor da amostra), significa que os antígenos procurados no teste se ligaram. Porém, se a mudança de cor for acentuada, a concentração do antígeno teste é muito baixa. Esta técnica é empregada quando o alvo é muito pequeno [196].

O Ensaio de Imunoeletrotransferência Ligada a Enzima *Blot* (EITB) é um teste que combina a alta sensibilidade dos testes imunoenzimáticos com a alta resolução da eletroforese em gel [199]. Esta técnica permite a transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS) para uma membrana adsorvente. As proteínas transferidas formam uma réplica exata do gel, permitindo detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas, principalmente aquelas que estão em baixas quantidades em determinada amostra [200].

Os métodos convencionais apresentam em comum a necessidade de pessoal habilitado e/ou treinado para a realização dos procedimentos, são demorados, requerem um laboratório ou envio de amostras a um laboratório especializado o que envolvem alto custo de análise [191, 201]. Métodos por múltiplos tubos e por meio de cultura, por exemplo, empregam grande quantidade de meio de cultura e vidrarias, exige a manutenção em cultivo e de longos período de incubação [189]. Além disso, procedimentos moleculares exigem, a acurácia do profissional no preparo das amostras e leitura dos resultados, tempo para reação adequada e diversos cuidados no manuseio e estocagem dos reagentes, que possuem alto custo no mercado [67].

Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas alternativas, com o objetivo de se obter uma resposta melhor, rápida e de baixo custo para o diagnóstico e detecção biológica.

3.9.2 *TAENIA SOLIUM*

A *Taenia solium* (*T. solium*) é um parasita que tem os humanos como hospedeiro definitivo e os suínos como hospedeiro intermediário. Sua incidência está associada à falta de saneamento básico, consumo da carne suína infectada crua ou mal-cozida [202, 203], sistema precário de criação de suínos e inspeção da carne [204, 205], a falta de orientação sobre como evitar a contaminação por *T. solium* e de ferramentas de diagnóstico [206].

A *T. solium* é responsável por transmitir dois tipos de infecções nos seres humanos: a teníase e a cisticercose. A teníase é uma infecção intestinal provocada pela presença da larva de *T. solium*, que no intestino torna-se adulta resultando em dores abdominais, náusea, perda de peso, diarreia, além da sua reprodução e liberação de ovos [15].

A cisticercose é o resultado da ingestão dos ovos ou proglotes de *T. solium* e que podem se romper no organismo, havendo a liberação da larva conhecida como cisticerco. No organismo, o cisticerco pode atingir a corrente sanguínea e resultar em infecções em tecidos como: músculos, pele, olhos e no sistema nervoso central [186]. Quando o cisticerco se desenvolve no cérebro a infecção é denominada por neurocisticercose (NCC), podendo causar fortes dores de cabeça, cegueira, convulsões, epilepsia e levar à morte [15, 207].

Um mapa da distribuição global da infecção por *T. solium* é apresentado na Figura 33.

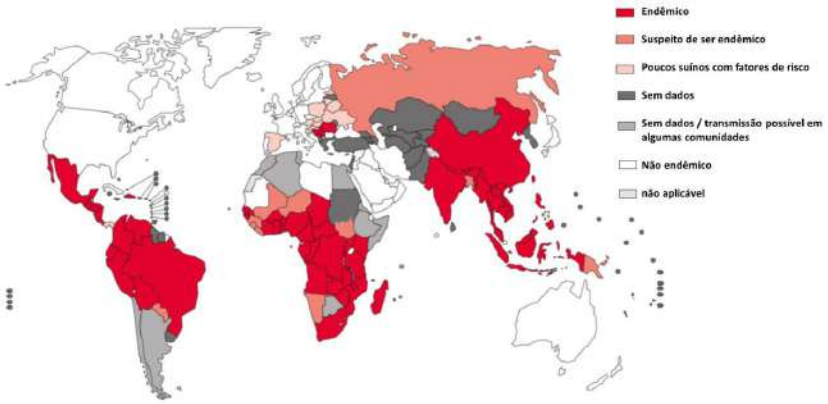


Figura 33 - Mapa da distribuição mundial da endemicidade de *T. solium* em 2015. Fonte: [20].

Como vistos na Figura 33, a *T. solium* é endêmica em países da América Latina, Haiti, África Subsaariana, Índia, Sudeste Asiático, China, Indonésia, Nova Guiné e Europa Oriental [18]. Grande parte destes casos se deve à falta de informações sobre sua carga e transmissão, falta de ferramentas de diagnóstico disponíveis em áreas com poucos recursos e de estratégias de intervenção para seu controle [206, 208]. Portanto, o controle da teníase/cisticercose depende das condições econômicas, sociais e culturais de cada região e país, tendo a educação sanitária como ferramenta fundamental [23, 24].

a) *Taenia solium*

As etapas que envolvem a transmissão da *T. solium* é mostrado na Figura 34.

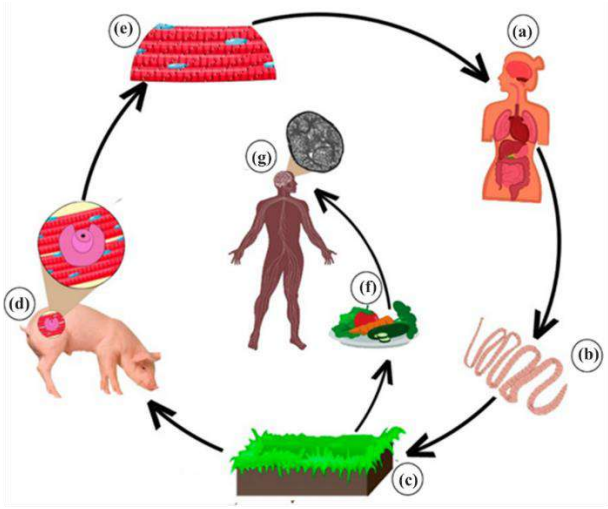


Figura 34 – Etapas de transmissão por *T. solium*.

A contaminação por *T. solium* pode iniciar-se com o consumo da carne de porco crua ou mal cozida contaminada com a larvas do parasita (Figura 34.a). Após a ingestão, os cistos ligam-se ao intestino delgado e tornam-se tênias adultas em meses, (Figura 34.b). Quando as tênias atingem a fase adulta produzem proglotes e/ou ovos, que se desprendem de seu corpo e são excretados nas fezes humanas podendo contaminar o solo, a água e os alimentos [209].

Os suínos (Figura 34.c) ou seres humanos (Figura 34.d) tornam-se infectados pela ingestão de ovos e/ou proglotes presente em alimentos contaminados e/ou mal higienizados [19, 24]. Após a ingestão dos ovos, eles eclodem no intestino e liberam embriões ou oncosferas, as quais penetram na parede intestinal, e através da corrente sanguínea, se distribui pelo corpo, podendo alcançar diversos tecidos como os músculos (Figura 34.d), cérebro (Figura 34.g), fígado e outros órgãos, nos quais se desenvolvem até cisticercos, [207]. Ao atingir o cérebro (Figura 33.g) causam a neurocisticercose (NCC) apresentando graves repercussões para a saúde humana [24].

Dependendo da localização e do número de cisticercos, os pacientes com neurocisticercose podem apresentar convulsões, sinais de hipertensão intracraniana, hidrocefalia, sinais neurológicos focais, estado mental alterado, ou meningite asséptica [207].

b) Diagnóstico da teníase e/ou cisticercose

O diagnóstico da doença e/ou portadores da teníase ou cisticercose consiste em um conjunto de critérios que requerem: avaliação clínica, dados radiológicos, análise epidemiológica e imunológica, métodos laboratoriais [210], parasitológicos, imagem por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e por Tomografia Computadorizada (TC) [22,23,211]. A TC e a RMN são empregadas para o diagnóstico e monitoramento da NCC forte ou moderada evidenciando o número e tamanho das lesões, a regressão da infecção e o nível da reação inflamatória do hospedeiro contra o parasita [212, 213].

Para diagnóstico de portadores da NCC por ensaio imunoenzimático ELISA para a detecção de anticorpos anticisticercais é necessária à coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) [208]. Uma das maiores dificuldades para a realização deste exame consiste na coleta de amostras de soro ou de líquido cefalorraquidiano (LCR) (um procedimento invasivo e delicado) [214] como mostrados na Figura 35.

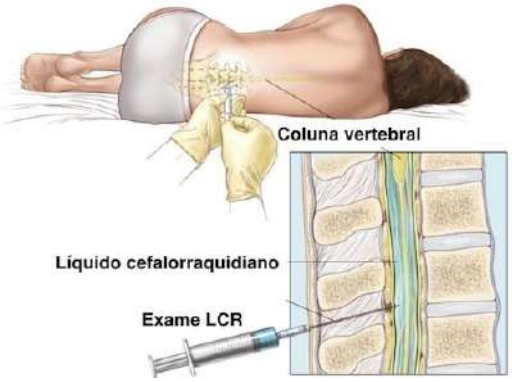


Figura 35 – Procedimento para coleta do líquido cefalorraquidiano para exames de diagnóstico de neurocisticercose. Fonte: [215].

Esse exame apresenta dificuldade na coleta das amostras [216], na necessidade de um laboratório próprio, de equipamentos e de tecnologias de alto custo [217].

Outro diagnóstico importante é o parasitológico, que consiste na coleta de três amostras fecais em dias alternados para detecção de ovos e assim detectar portadores da teníase e impedir a propagação do seu ciclo [23, 218]. Também podem ser aplicados o método Proteína C- reativa (PCR) para aumentar a sensibilidade na detecção do parasita nessas amostras [219].

Todas essas técnicas convencionais baseadas em laboratório oferecem alta seletividade e sensibilidade para vários diagnósticos, mas requerem mais tempo, alto custo, um técnico especializado para análise [217] e muitas vezes não estão disponíveis em áreas endêmicas de *T. solium* [220] ou não permitem o diagnóstico no local de atendimento levando ao atraso no envio dos resultados aos pacientes [55]. Além disso, após a detecção o tratamento geralmente envolve semanas a meses de medicação com monitoramento rigoroso de efeitos colaterais e imagens cerebrais em série [18].

Nesta finalidade, existe a necessidade do desenvolvimento de sistemas de detecção de infecções causadas por *T. solium* que sejam precisos, portáteis, menos invasivos, acessíveis, de baixo custo e que seja uma alternativa frente a deficiências das técnicas convencionais e que ficou evidenciada durante a pandemia de COVID-19, onde a demanda por um diagnóstico rápido aumentou exponencialmente [33, 55].

4.MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento e caracterização dos nanobiossensores nas diferentes etapas e processos.

O procedimento de fabricação está dividido em dois tópicos que consistem no: desenvolvimento de nanobiossensores por SPR e por LSPR.

4.1 REAGENTES QUÍMICOS

Os reagentes químicos utilizados neste trabalho foram de alto grau de pureza e são apresentados a seguir: Tetrachloroaurate de hidrogênio III ($HAuCl_4.3H_2O$), citrato de sódio di-hidratado ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$), polivinilpirrolidona $(C_6H_9NO)n$, brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), borohidreto de sódio ($NaBH_4$), ácido ascórbico (CNO_6), nitrato de prata (CNO_6H_6) dicloridrato de cistamina ($C_4H_{12}N_2S_2.2HCl$), Cisteamina 95 % (C_2H_7NS), 2-mercaptoetanol BME (C_2H_6OS), álcool isopropílico 95 % (V/V) (C_3H_8OH) N-Hidroxisuccinimida (NHS) ($C_4H_5NO_3$), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-carbodiimida (EDAC) ($C_8H_{17}N_3.HCl$), 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) 99 %, o cloreto de sódio ACS 99 % (NaCl), fosfato de sódio dibásico 99 % (Na_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico 99 % (KH_2PO_4) usados como solução salina tamponada com fosfato ou tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2, todos da *Sigma* (*Sigma-Aldrich*, Cotia, SP., Brasil).

O Álcool etílico absoluto (C_2H_6O) 99,5 % da *Synth* (*LabSynth*, Diademan, SP., Brasil), N-hidroxissulfosuccinimida (Sulfo-NHS) e cloridrato de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) da *Thermo Fisher* (*Thermo Fisher Scientific*, *Waltham, Massachusetts*, EUA). A Acetona 99,5 % da *Hexis* (*Hexis Científica*, São Paulo, SP, Brasil), a sacarose ($C_{12}H_{12}O_{11}$) e a Albumina de Soro Bovino (BSA) da *Merck* (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ., Brasil).

Para visualização da bactéria *E. coli* foi empregado a solução de Safranina a 0,25 % da *Reagen* (Gênesis Científica, Goiânia, GO., Brasil). Para limpeza e secagem de superfícies foi empregado o gás nitrogênio 5,0 ultrapuro da *Linde* (Linde gases, Rio de Janeiro, RJ., Brasil). Todas as soluções estoques e diluições adicionais foram preparadas usando água ultrapura e todas as vidrarias foram limpas em solução piranha (Ácido sulfúrico / Peróxido de hidrogênio, 4:1).

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

a) *Escherichia coli* - O anticorpo empregado neste estudo foi o anti-*Escherichia coli* policlonal IgG proveniente de coelhos *Bio-Rad* (*Bio-Rad, Hercules, California, EUA*). A bactéria *Escherichia coli* O55 enteropatogênica (EPEC), do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS): 00181, Lote: 0608181 foi fornecida pela Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ).

b) *Salmonella entérica serovar paratyphi* e a *Bacillus subtilis* foram fornecidas pelo laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ.

c) *Taenia solium* - Anticorpos *Anti-T.solium* monoclonal (Ac) Ab (0,75 mg/mL) e antígeno de *T. solium* (Ag) (0,70 mg/mL) detectado em amostras de fluido vesicular de *T. solium (VF-Tso)* foram fornecidas pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes-UFRJ em diferentes concentrações e diluídas em solução tampão PBS (pH 7,2). As alíquotas de anticorpos e antígenos foram mantidas congeladas até o uso.

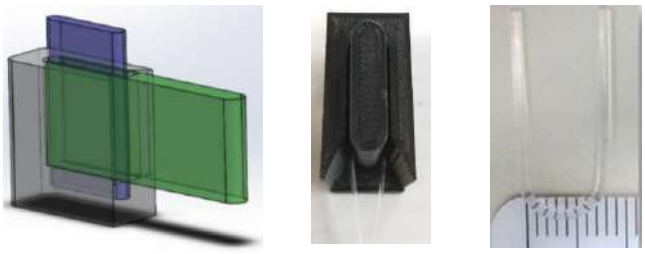
4.3 NANOBIOSSENSOR POR SPR

4.3.1 CONSTRUÇÃO DO SENSOR

A construção do nanobiossensor por SPR consiste nas seguintes etapas: construção do sensor em forma de “U”, deposição do nanofilme de ouro, caracterização, montagem da instrumentação optoeletrônica, protocolo de imobilização e testes.

Os sensores em “U” foram fabricados usando POF do tipo multimodo da *Mitsubishi Rayon Eska*® GH 4001 (*Mitsubishi Rayon, CO., LTD*, Tóquio, Japão), sem capa de proteção e com 1 mm de diâmetro, sendo 980 µm de núcleo e 20 µm de casca. Foram produzidos sensores retos com trechos de 12 cm de comprimento e colocada em um molde fabricado em impressora 3D (RAISED) em poliácido láctico (PLA) para moldagem da POF em “U” com 8 mm de diâmetro e 6 cm de comprimento, medidas essas testadas em laboratório, e permitindo a fabricação de 10 sensores ao mesmo tempo.

Após instalado no molde, os trechos de 10 fibras foram aquecidos em uma estufa de secagem com circulação de ar forçada *Prolab* (*Prolab*, São Paulo, SP., Brasil) por 1 hora a 65 °C. Em seguida as fibras permanecem na estufa até que que se atinja a temperatura de 25 °C. Após isso, suas extremidades são clivadas e polidas usando a lixa de óxido de alumínio de 3 µm da *Polish Film*. As imagens do molde e da POF em “U” são vistas na Figura 36.



(a) (b) (c)

Figura 36– (a) Peças que compõem a moldagem do sensor em "U" vistos em perspectiva; (b) Molde impresso em impressora 3D contendo uma POF; (c) Sensor em "U" clivado e polido.

Após a clivagem e polimento os sensores em "U" foram limpos em álcool isopropílico, lavados em água ultrapura, secos em gás nitrogênio, onde em seguida foram deixados em um dessecador até o momento da deposição do filme de ouro.

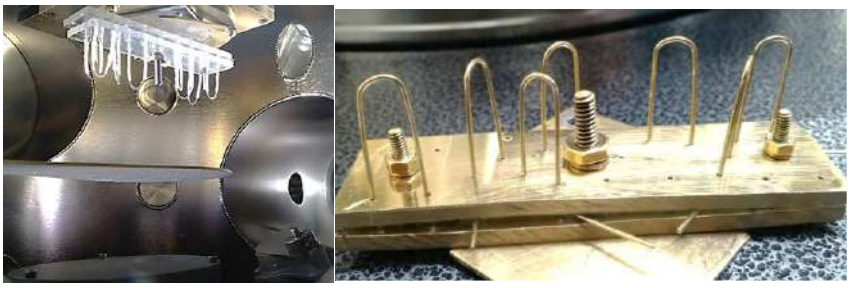
a) Deposição do nanofilme de ouro e caracterização

Primeiramente, lâminas para microscopia com 26 x 76 mm de medida foram limpas em água ultrapura seguido de banho de ultrassom com álcool isopropílico por 20 minutos. Após este período, as lâminas foram enxaguadas em água ultrapura e secas em gás nitrogênio.

Os filmes foram depositados em triplicata durante 20 minutos usando a técnica de pulverização catódica por radiofrequência (RF) em um *Magnetron Sputtering* (*Aja International, Sciture*, MA, EUA) do Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF). O equipamento foi parametrizado com base em estudos anteriores [123] onde ficou definido uma potência do plasma de 40 W, pressão de gás argônio em 3 mTorr, vazão do argônio de 12 cm^3/min em condições padrão de temperatura e pressão e substrato instalado a uma altura do suporte de 55 mm a 20 rotações por minuto (rpm).

As espessuras dos nanofilmes foram medidas em um perfilômetro *DektakXT* (*Brukers, Billerica, Massachusetts, EUA)* do Laboratório de Superfície e Filmes Finos do Programa de Engenharia de Materiais e Metalurgia da COPPE/UFRJ. A espessura foi obtida calculando a média das medidas em três posições da lâmina: lateral esquerda, centro e lateral direita. Em cada ponto foram realizadas cinco medidas.

Após a caracterização, foi produzida uma camada de nanofilme de ouro de 70 nm de espessura (nas mesmas condições especificadas na caracterização) a uma taxa de deposição de 3,5 nm/min e depositada sobre a fibra óptica em "U", (Figura 37.a). Os sensores POF em "U" com filme fino de 70 nm de ouro podem ser vistos na Figura 37.b.



(a) **(b)**

Figura 37 - (a) Sondas em "U" prontas para deposição na câmara de pulverização catódica; (b) Sondas em "U" e revestidas com o nanofilme de ouro de 70 nm após pulverização catódica.

A camada de ouro tem como objetivo de garantir a imobilização biológica e promover o efeito do SPR, além de ser um metal com elevada estabilidade química e alta resistência à corrosão [58, 94].

b) Configuração optoeletrônica do nanobiossensor

O sistema optoeletrônico é formado por uma fonte de luz (*HL-2000, Ocean Optics*), um espectrômetro (*HR-4000, Ocean Optics*) acoplado ao sensor em "U" e um sistema de aquisição de dados feito pelo *software SpectraSuite*. As medidas foram feitas no Laboratório de Instrumentação e fotônica (LIF/UFRJ) em mesa óptica com sistema pneumático antivibração e à temperatura ambiente de 25 °C. Na Figura 38 é mostrada a configuração optoeletrônica.

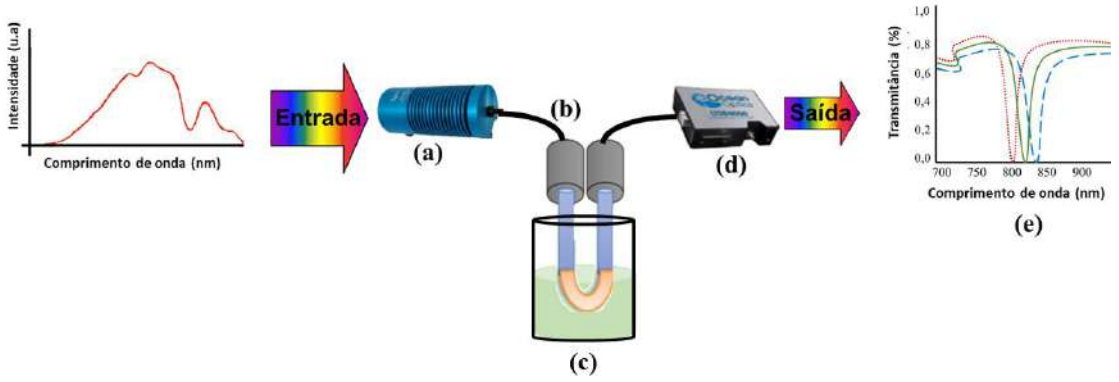


Figura 38 - Configuração optoeletrônica para ensaios com o nanobiossensor em "U" por SPR; (a) fonte de luz branca; (b) sensor em "U"; (c) analisador de espectro óptico (OSA).

A luz branca (Figura 38.a) foi guiada através da fibra óptica até a conexão e o sensor em "U" (Figura 38.b) que estava imerso na amostra (Figura 38.c). Em função do IR do meio, alguns modos de comprimentos de onda são absorvidos e outros são conduzidos para o analisador de espectro óptico (OSA) (Figura 38.d). Em seguida, os resultados foram exportados para o *Excel*®, (Figura 38.e).

c) Sensibilidade

As curvas de sensibilidade dos sensores em "U' com o nanofilme de ouro foram obtidas por meio da variação do IR do meio circulante. Com este objetivo, concentrações de sacarose foram produzidas nas quantidades de 15, 25, 35 e 55 P/V de massa de sacarose, onde foram dissolvidos em 10 mL de água ultrapura e solubilizados em agitador de tubos tipo vórtex *(Phoenix*, São Paulo, SP., Brasil*).* O índice de refração foi medido no Laboratório de Instrumentação e fotônica (LIF/UFRJ) em uma sala com a temperatura ambiente controlada em 25,0 ± 0,5 °C usando um refratômetro Abbe de bancada (*Quimis*, Diadema, SP., Brasil). Foram feitos a aferição do refratômetro, apresentando boa repetibilidade, compatível com a incerteza do instrumento declarada pelo fabricante, de 0,0002 RIU.

As concentrações de sacarose foram escolhidas de modo a produzir variações de IR entre 1,33 a 1,39 RIU correspondentes a faixa de interesse para medidas de suspensões bacterianas [191, 221].

Os resultados foram apresentados em função da variação da amplitude do espectro de transmitância produzidos pela variação do IR do meio. Os comprimentos de onda com maior sensibilidade foram selecionados e apresentados.

d) Protocolo de imobilização e testes

O protocolo de imobilização foi adaptado do protocolo proposto por CELIKKOL-AYDIN, *et al.,* 2014 [134] e consiste inicialmente na limpeza do nanossensor (POF contendo o filme fino de ouro) em álcool isopropílico, seguidos pelo enxágue em água ultrapura. Em seguida, as curvas das sondas foram imersas em uma solução de cisteamina a 4 mM por 1,5 horas. Posteriormente, as sondas foram lavadas primeiro com álcool etílico absoluto e depois em água ultrapura por duas vezes. Faltando 5 minutos para o término da imobilização das POF em cisteamina, inicia-se a ativação do anticorpo que consiste no preparo de uma solução de PBS, 100 mM de EDAC e 40 mM de NHS. Em seguida, uma concentração de anticorpo *anti-E. coli* a10 µg/mL foi adicionada à solução e deixada em repouso por 15 minutos para ativação dos grupos de ácido carboxílico. Enquanto os anticorpos são ativados, a fibra óptica em "U" já imobilizada são então preparadas para receber os anticorpos.

As sondas imobilizadas foram então imersas na suspensão previamente ativada e deixadas por 1 hora para imobilização dos anticorpos no sensor Film-Au, como podem ser vistos na Figura 39.



Figura 39 –Destaque para a imersão da suspensão de anticorpos sobre a superfície curva do sensor em "U" com o nanofilme de ouro.

Após isso, as sondas com anticorpos foram imersas em solução de albumina de soro bovino (BSA) a 10 mM e deixadas por 30 minutos para bloquear grupos funcionais que não reagiram. Por último, as sondas foram lavadas em uma solução tampão PBS a 10 mM por três vezes para a remoção do anticorpo não ligados.

As concentrações das suspensões bacterianas foram preparadas através do padrão de turbidez *McFarland* 0,5 por comparação visual e medidas da absorbância para o preparo de suspensões bacterianas na concentração de $1{,}5\times10^{8}$ UFC/mL [222]. A partir do padrão *McFarland* 0,5, outras concentrações foram obtidas por meio de diluição.

Por se tratar de um método de comparação visual, as concentrações das suspensões foram confirmadas através da medida da absorbância no espectrofotômetro, 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 para a transmissão de luz em uma cubeta de quartzo [222, 223]. Todas as suspensões bacterianas foram preparadas utilizando uma suspensão constituída de cloreto de sódio a 0,85 (P/V).

As bactérias empregadas neste estudo foram preparadas usando os seguintes meios de cultura:

- *E. coli O55* foram preparadas em meio de cultura em Ágar Triptona de Soja (TSA) previamente incubada durante 24 horas a 37 °C;
- *Salmonella entérica serovar paratyphi* cultivada em meio de cultura de Caldo Tríptico de Soja (TSB) e em caldo de Ágar Triptona de Soja (TSA) respetivamente a uma temperatura de 35 ºC.
- *Bacillus subtilis* foram cultivadas em caldo de Ágar Triptona de Soja (TSA) a 25 ºC. A bactéria *Salmonella* foi empregada nos ensaios de seletividade por se tratar de uma bactéria gram-negativa, ou seja, apresenta parede celular muito espessa. Já o *Bacillus subtilis* integram as bactérias gram-positivas, apresentando, portando uma parece celular

menos espessa o que resultam em menores resistências aos antibióticos e ao corante usado.

4.3.2 CARACTERIZAÇÃO

Após os testes com as bactérias, os nanobiossensores juntamente com lâminas de vidro de microscopia óptica foram submetidos à solução de Safranina por 5 segundos, seguidos pelo enxágue em água ultrapura até a remoção do excesso do corante da superfície e deixados secar à temperatura ambiente. Após a secagem, os nanobiossensores estão prontos para serem visualizados em Microscópio Ótico (MO) com aumento de 400 vezes e por imersão em óleo natural mineral com lente objetiva de 1000 vezes.

Este procedimento de coloração é importante pois o corante adere à parede das bactérias gram-negativas apresentando coloração vermelha e deste modo permitindo a visualização.

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*.

As micrografias da superfície do sensor após a imunocaptura, foram visualizadas em Microscopia Eletrônico de Varredura (MEV). As amostras foram previamente preparadas realizando a secagem em Ponto Crítico. Nesta secagem a Ponto Crítico, a amostra é preenchida com dióxido de carbono (CO_2) líquido e submetida a um processo controlado de aumento da temperatura e pressão de modo que o CO_2 atinja o seu estado supercrítico. Em seguida a pressão é reduzida até que o CO_2 esteja em seu estado gasoso. Ao fim, o CO_2 é liberado para a atmosfera e a amostra biológica está seca e com toda sua estrutura morfológica preservada.

4.4 NANOBIOSSENSOR POR LSPR

A fabricação do nanobiossensor por LSPR consiste nas seguintes etapas: sínteses das nanopartículas de ouro (AuNPs) por duas rotas químicas, caracterização, sensibilidade, aminação da superfície das NPs, estabilidade química, continuidade das etapas de funcionalização das AuNPs e testes com antígenos de *T. solium*, configurando o sensor 1. O sensor 2 consiste na imobilização das AuNPs sobre a superfície da POF em "U", seguidos pela funcionalização e testes com antígenos de *T. solium*. Um fluxograma resumido das etapas é apresentado na Figura 40.

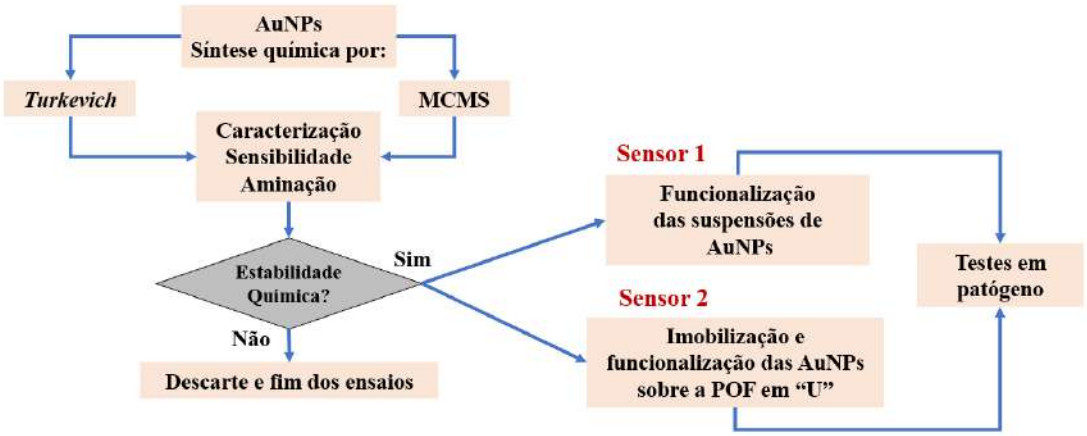


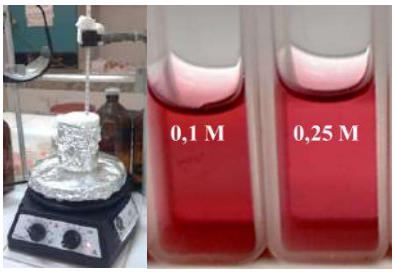
Figura 40– Fluxograma das etapas da fabricação dos sensores por LSPR.

4.4.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNPs foram sintetizadas em meio aquoso por dois métodos: *Turkevich* por redução em citrato de sódio [35, 39] e pelo Método de Crescimento Mediado por Semente (MCMS) [40, 41]. Diferentes métodos de síntese foram realizados para a obtenção de NPs com diferentes distribuições de tamanho, de revestimentos e avaliação da compatibilidade da funcionalização para detecção do antígeno *T. solium* (Ag).

Os dois protocolos de síntese são apresentados a seguir:

a) Método de *Turkevich*: duas sínteses foram realizadas por este método, utilizando duas concentrações de $HAuCl_4.3H_2O$ também conhecido por sal de ouro. Ambas as sínteses foram produzidas ao mesmo tempo, sendo adicionado 25 µL de solução a 0,1 M na primeira e 0,25 M de $HAuCl_4.3H_2O$ na segunda síntese, a 25 mL de água ultrapura, onde foram aquecidos a 70 °C sob agitação constante a 300 rotações por minutos (rpm). Após atingir a temperatura, 750 µL de citrato de sódio di-hidratado 0,034 M ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) foram adicionados em ambas as sínteses e mantidos sob agitação e aquecimento por 20 minutos (Figura 41.a) quando a cor mudou de cinza-azulado para vermelho-púrpura. Em seguida, as suspensões foram agitadas por mais 10 minutos, seguidos pela adição de 3,4 mL de polivinilpirrolidona 0,45 M ($(C_6H_9NO)n$) e incubadas *overnight* à temperatura ambiente. Após este período, as suspensões foram centrifugadas HERMLE (*LaborTechnik, Wehinger*, Alemanha) a 17,530 gravidades (g) por 15 minutos, seguido da remoção do sobrenadante e suspensão em água ultrapura. Os aspectos finais das suspensões das AuNPs podem ser vistos na Figura 41.b.



(a) (b)

Figura 41– Suspensão de AuNPs pelo método de *Turkevich;* (a) imagem do preparo da suspensão de AuNP; (b) suspensões de AuNPs produzidas nas concentrações de 0,1 M e 0,25 M de sal de ouro.

As suspensões foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C, em embalagens de vidro, protegidos da luz até o momento de serem usadas.

b) Método de Crescimento Mediado por Semente (MCMS): as AuNPs foram preparadas empregando este método adaptado de Lanh, L.T., *et al*., (2015) [40] e de Silva, M.G.A., *et al*., (2013) [41] e que consistem em duas etapas: a produção da suspensão semente e a de crescimento. A suspensão semente foi preparada pela mistura de 10 mL CTAB a 0,1 M e 250 µL de $HAuCl_4.3H_3O$ a 10 mM, com agitação constante a 300 rpm e 27 °C por 5 minutos. Uma vez misturados, foram adicionados 600 µL de $NaBH_4$ a 10 mM refrigerado a 4 °C, mantendo a agitação por 15 minutos. A suspensão semente foi reservada a 27 °C por 3 horas antes do uso e apresentou coloração âmbar, como pode ser vista na Figura 42.a.

Para preparar a suspensão de crescimento, foram misturados 100 mL de CTAB 0,1 M, 80 µL de $AgNO_3$ 0,1 M e 5 mL de $HAuCl_4.3H_3O$ a 10 mM, respectivamente. Em seguida, 600 µL de $C_6H_8O_6$ a 0,1 M foram adicionados gota a gota. A suspensão incolor resultante foi mantida a 48 ± 2°C e 300 rpm por uma hora. Posteriormente, 60 µL de suspensão semente foram adicionados sob agitação por 20 minutos, alterando a cor para um rosa cereja, que em seguida foi incubado *overnight*, (Figura 42.b). Finalmente, a suspensão final das AuNPs (Figura 42.c) foi centrifugada a 17,530 g por 15 minutos para remover o excesso de CTAB e redisperso as nanopartículas em água ultrapura. A característica visual das AuNPs, podem ser vistas na Figura 42.c.



(a) (b) (c)

Figura 42 – (a) Suspensão semente; (b) Suspensão de AuNPs pelo MCMS após síntese e (c) Após *overnight*.

Os espectros de absorbância das duas sínteses foram medidos em espectrômetro e as curvas foram ajustadas no *software Peakfit 4.12.* (*Systat Software Inc, EUA*) por meio da função "*deconvolução gaussian*,". Em seguida, foi feito o cálculo a partir da derivada da curva de absorbância para encontrar o valor do comprimento de onda de absorção máximo de cada suspensão de AuNP.

4.4.2 SENSIBILIDADE DAS SUSPENSÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

A sensibilidade das suspensões de AuNPs foram medidas pela solubilização de 15, 25, 35, 50 (P/V) de sacarose (de modo a produzir variações de IR entre 1,33 a 1,40 RIU) em 2 mL de suspensões de nanopartículas de ouro.

O índice de refração foi medido usando um refratômetro Abbe de bancada (25,0 e 25,5 °C). Os resultados foram apresentados em função da variação do pico máximo de absorbância em função do IR do meio.

4.4.3 PROTOCOLO DE FUNCIONALIZAÇÃO - SENSOR 1

Para a funcionalização da superfície das AuNPs com anticorpos específicos, são necessários a realização das seguintes etapas: aminação para promover a modificação da superfície das NPs, ativação do (Ac) e conjugação da suspensão aminada com o anticorpo (Ac). Assim sendo, vários protocolos e ensaios foram realizados em busca de um protocolo que apresentasse melhor biocompatibilidade com as características das AuNPs empregadas. O protocolo aqui descrito foi adaptado de [224] e cada etapa do procedimento é detalhada nos itens a seguir.

a) AMINAÇÃO

Neste processo, utilizou-se a solução de dicloridrato de cistamina (Cys) para a substituição do estabilizante e formação da ligação covalente sobre a superfície das AuNPs. Esta molécula é a mais empregada na aminação das superfícies de suspensões de

ouro [171, 225] e durante os ensaios foram testadas outras moléculas, contudo, esta foi a que apresentou maior eficiência na remoção do estabilizante CTAB.

Inicialmente para avaliar a melhor concentração para aminação, 1 mL de suspensão de AuNPs foram solubilizados em 5, 10, 15 e 20 µL de dicloridrato de cistamina ($C_4H_{12}N_2S_2.2HCl$) a 0,1 M (1:100) e mantidos a 48 ± 2 °C sob sonicação constante por 2 horas. Um esquema do procedimento é demonstrado na Figura 43.

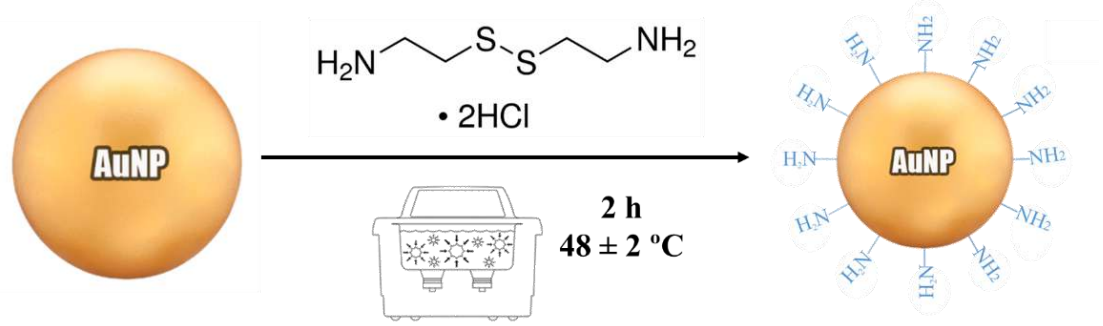


Figura 43 – Etapas da aminação da suspensão de AuNPs em presença da molécula de dicloridrato de cistamina.

Nesta etapa houve o rígido monitoramento da temperatura, pois é ela a principal responsável pela dissociação do estabilizante na superfície das NPs.

Após o término da aminação e a redução da temperatura para 25 °C, as NPs aminofuncionalizadas (AuNPs-Cys) foram medidas para determinar o comprimento de onda do pico máximo de absorção e comparadas com a suspensão de AuNPs não aminadas.

b) ATIVAÇÃO DO ANTICORPO

O anticorpo *Anti-T.solium* monoclonal (Ac) na quantidade 2 µg, foi ativado pela adição de 1 µL a 50 mg/mL de Sulfo-NHS e 1 µL a 50 mg/mL de EDC. A mistura foi mantida a 25 °C por 20 minutos, com agitação em intervalos de 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 µL de BME a 20 mM.

c) CONJUGAÇÃO

Para a imobilização covalente do anticorpo (Ac) na superfície das NPs aminofuncionalizadas, 200 µL AuNPs-Cys foram incubados com o Ac monoclonal ativado, e mantidos por 18 horas a 4 °C. Após a incubação, o comprimento de onda de absorção máxima da LSPR da suspensão de AuNPs biologicamente funcionalizadas foi determinado. Uma representação esquemática deste protocolo é apresentada na Figura 44.

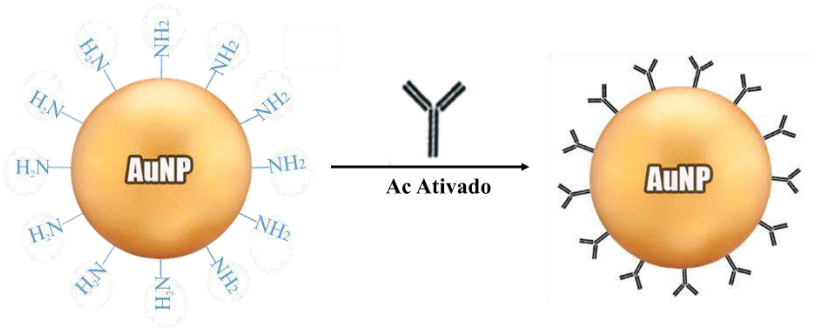


Figura 44 - Representação esquemática das AuNPs aminofuncionalizadas e conjugadas com o anticorpo *Anti-T. solium* policlonal (Y).

d) TESTE DE ESTABILIDADE

O teste de estabilidade foi aplicado às suspensões de AuNPs que apresentou melhor biocompatibilidade com o protocolo de funcionalização. Este teste apresenta como finalidade obter informações sobre a durabilidade das amostras. Portanto, para o monitoramento, as amostras foram armazenadas em *Eppendorfs* de 1,5 mL à temperatura de 4 ºC e protegido da luz. As suspensões foram separadas da seguinte forma:

- AuNP (*Turkevick* ou MCMS)
- AuNP-Cys (a ser armazenada e medida a cada semana)
- AuNP (*Turkevick* ou MCMS) (para ser aminada a cada semana)

Uma vez por semana durante nove semanas, as amostras foram preparadas e monitoradas visualmente e em espectrômetro para levantamento do espectro de absorbância. Os resultados são apresentados no item 5.2.3.

4.4.4 DETECÇÃO DO ANTÍGENO DE *T. solium* - SENSOR 1

A detecção de antígenos de *T. soluim* ocorreu pela adição de 142,5 µL da suspensão de AuNPs-Ac (biologicamente funcionalizados), seguidos pela adição do antígeno de *T. solium* (Ag) na concentração de 30 mg/mL e pela medida dos deslocamentos dos comprimentos de onda de absorção do LSPR em um intervalo de 5 minutos. Primeiramente a concentração de antígeno testada foi de 2,0 µg/mL, e a seletividade do nanobiossensor foi avaliada comparativamente usando três diferentes concentrações da bactéria *Escherichia coli* O55 diluída em PBS (pH 7,2) como controle negativo.

Posteriormente, foram realizados com amostras de *T. solium* Ag diluída em PBS (pH 7,2) em seis concentrações diferentes: 0,1; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,6 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicatas para a repetibilidade do processo. Por fim, foram testadas em amostras de soros humanos positivos e negativos.

4.4.5 TESTES COM SORO HUMANO - *T. solium* - SENSOR 1

Amostras de soro humano foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto Paulo de Góes da UFRJ para ensaios com o nanobiossensor. Foram fornecidas amostras de soro positivo obtido de pacientes portadores da neurocisticercose sintomática, e de soro negativo de pacientes saudáveis.

4.5 CARACTERIZAÇÃO - SENSOR 1

4.5.1 ESPECTROSCOPIA UV-Vis

As bandas de absorbância das suspensões de AuNPs foram medidas usando um espectrofotômetro (HR-4000, *OceanOptics, Winter Park, U.S.*), uma cubeta de quartzo (*Hellma*) de 400 µL, com caminho óptico de 1 cm, uma fonte de luz (*Thorlabs modelo SLS201L*) e um sistema de aquisição de dados (*OceanView*). As medidas foram feitas no Laboratório de Instrumentação e fotônica (LIF/UFRJ) em mesa óptica com sistema pneumático antivibração e a temperatura de ambiente de 25 °C. Na Figura 45 é mostrado a configuração optoeletrônica.

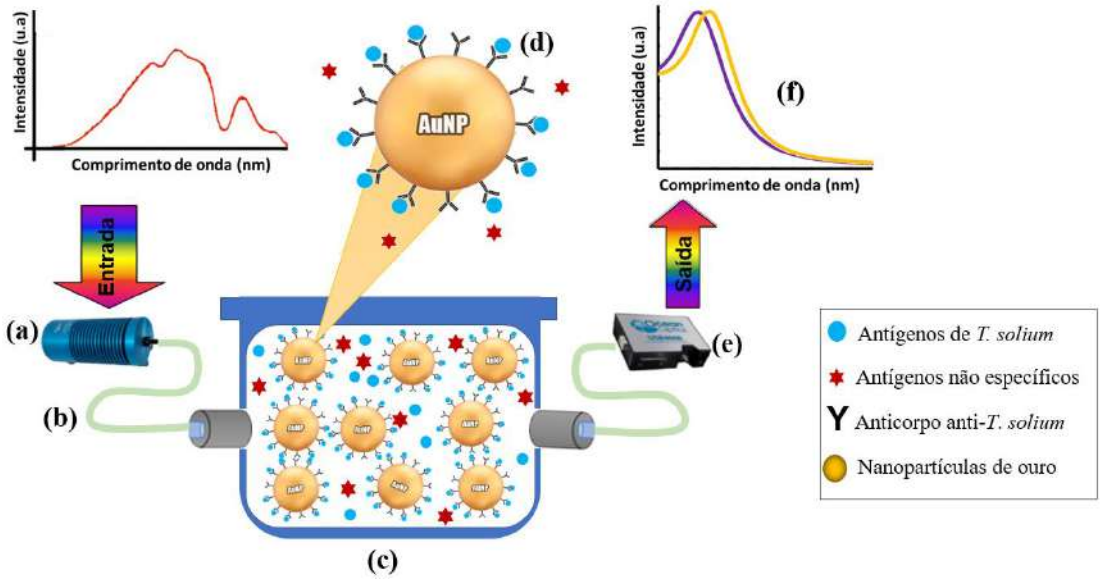


Figura 45 - Configuração optoeletrônica usada na medida do nanobiossensor por suspensão de AuNPs; (a) Fonte de luz branca; (b) Fibra óptica; (c) Cubeta; (d) AuNPs funcionalizadas;(e) Analisador de espectro óptico (OSA); (f) Espectro das AuNPs antes e após a detecção.

A luz branca (Figura 45.a) é guiada através de uma fibra óptica (Figura 45.b) para dentro de uma cubeta (Figura 45.c) contendo as AuNPs (Figura 45.d) e a amostra biológica.

Em função da detecção biológica na superfície do nanobiossensor, mudanças de IR acontecerão e alguns comprimentos de onda serão absorvidos. A luz resultante da absorção é guiada para um analisador de espectro óptico (OSA) (Figura 45.e). Em seguida, os resultados são exportados para os *softwares* e*xcel*® e *Origin®Pro2021*

(Figura 45.f) e as curvas dos espectros de absorbância são ajustadas por *software Peakfit 4.12.* para facilitar a determinação do valor máximo do pico de comprimento de onda.

Essas medidas foram feitas para as suspensões de AuNPs após cada síntese, durante cada etapa da funcionalização e na detecção biológica.

4.5.2 MICROSCOPIA

Detalhes morfológicos das AuNPs foram analisados por Microscópio Eletrônico de Varredura por Transmissão STEM (*FEI TECNAI G2-F20, AmesLab, EUA*) da Divisão de Metrologia de Materiais (DIMAT) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) em Xerém-RJ para AuNPs sintetizadas pelo método de *Turkevich*. As AuNPs sintetizadas pelo MCMS foram analisadas por um Microscópio Eletrônico de Varredura de feixe duplo SEM (*FEI Versa 3D, Thermo Fisher Scientific*, EUA) do Núcleo de Microscopia Eletrônica da COPPE/UFRJ. Como suporte para as NPs foram empregados a grade em cobre revestida com filme de carbono ultrafino tipo A 400 *mesh*, (*Pelco, Ted Pella*). O tamanho das AuNPs e a incerteza foram calculados com base nos resultados obtidos pela microscopia.

4.5.3 POTENCIAL ZETA

A carga superficial das suspensões de AuNPs, após a síntese, etapas de funcionalização biológica e detecção de antígenos, foram medidas através do potencial Zeta (analisador *Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments*, Reino Unido) em um ângulo de 90° em temperatura ambiente, usando uma cubeta de potencial ômega zeta com um eletrodo positivo e um negativo com capacidade para 400 µL de amostra. O tempo de equilíbrio foi fixado em 120 segundos e 10 execuções.

Esta técnica foi aplicada para o monitoramento da estabilidade química da superfície das AuNPs.

4.6 NANOBIOSSENSOR POF EM “U” COM AUNP - SENSOR 2

As etapas de fabricação, consistem em: remoção da casca e moldagem da POF, funcionalização da superfície curva do sensor a fibra óptica, imobilização das AuNPs, testes de sensibilidade, imobilização dos anticorpos e testes.

4.6.1 FABRICAÇÃO DO NANOBIOSSENSORE POF EM “U”

Os sensores em “U” a serem imobilizados com AuNPs foram fabricados usando trechos retos de POF com 12 cm de comprimento e com a remoção de aproximadamente 2 cm da casca pertencente à curva do sensor, como mostrado na Figura 46.

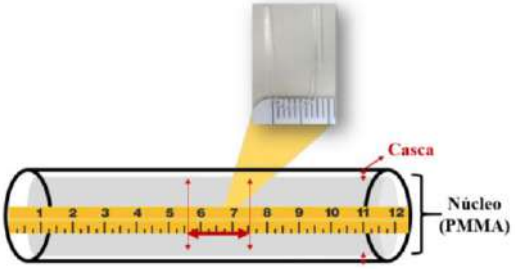


Figura 46 –Esquema do trecho de uma POF com a seleção da região para remoção da casca, antes da moldagem.

A remoção da casca na região curva do sensor é necessária para a imobilização das suspensões das AuNPs na superfície do núcleo da POF, ao qual a composição química é conhecida. Para a remoção da casca, foram usados lenços de limpeza antiestático (*Kimtech Kimwipe*) umedecidos em acetona, seguidos pela fricção da superfície curva da POF até que a casca seja removida. Imediatamente, após a fricção e a remoção da casca, o sensor foi imerso em água ultrapura para evitar que o núcleo da POF reaja com a acetona.

Após a remoção da casca, e limpeza dos sensores em álcool isopropílico, seguidos pelo enxágue em água ultrapura e secagem em gás nitrogênio, os mesmos foram visualizados em microscópio ótico para a verificação de possíveis rachaduras. Após isso, as fibras foram moldadas em “U” como especificado no item 4.3.

4.6.2 FUNCIONALICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO - SENSOR 2

A funcionalização tem por objetivo facilitar a imobilização das AuNPs de modo a promover maior sensibilidade ao sensor. À medida que as AuNPs são imobilizadas sobre a superfície funcionalizada, as NPs tornam-se mais estáveis, evitando agregações [226].

O preparo da superfície da fibra e a imobilização foi orientado usando como base os procedimentos propostos por Halkare, P., *et al.*, (2015) [77], Chen, I.C., *et al*., (2011) [227], Chen, J., *et al*., 2015 [228] com algumas adaptações e que consiste em três etapas: funcionalização do sensor a POF em “U”, imobilização das AuNPs na região curva e sensível do sensor e imobilização dos anticorpos.

A funcionalização da porção curva do sensor em “U” consiste na limpeza da superfície em álcool isopropílico, seguidos pelo enxágue em água ultrapura e secagem em gás nitrogênio. Após isso, o sensor foi imerso em um béquer de 5 mL contendo 3 mL

da solução de NaOH a 0,1 M e deixados por 24 horas à temperatura ambiente (Figura 47.a). Este processo consiste na hidrólise dos grupos funcionais etanoato de etila (- $COOCH_3$) presentes na superfície do sensor a POF, convertendo em grupos funcionais carboxílicos (-COOH). A área de detecção foi então enxaguada, secas e submersas por 3 horas à temperatura ambiente em uma solução preparada pela mistura de 0,12 g de APTES, 0,1 g de NHS e 0,14 g de EDC solubilizados em 50 mL de água ultrapura (Figura 47.b).

As fibras foram então limpas em água ultrapura e secas a 50 °C em estufa por 15 minutos [227]. Esta etapa é responsável pela conversão do grupo funcional carboxílicos (-COOH) em grupamentos amida (-$CONH_2$) que tem afinidade com as suspensões de nanopartículas de ouro na fase aquosa por atração eletrostática entre AuNPs negativas e cobertas por CTAB [227, 229] (Figura 47.c). Após a redução da temperatura, os sensores foram então imersos em suspensão coloidal de AuNPs pelo MCMS e deixados a temperatura ambiente por 5 horas, tempo este testado para uma melhor aderência das AuNPs (Figura 47.d). Logo após, foram retirados, enxaguados e embebidos em água ultrapura por um dia.

Um esquema das etapas é apresentado na Figura 47.

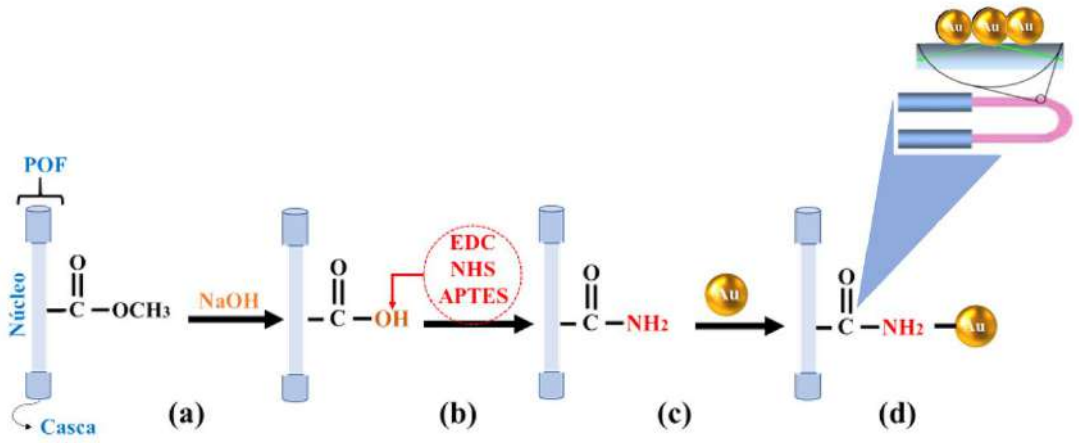


Figura 47- Diagrama do processo de preparo e imobilização das suspensões de AuNPs sobre a região sensível do sensor em "U"; (a) hidroxilação da superfície da POF; (b) formação de uma amida com a adição do EDC, NHS e APTES; (c) adição da suspensão de AuNPs; (d) POF imobilizada com AuNPs. Fonte: Adaptado de [68, 227].

Após a imobilização das AuNPs, os sensores a POF em "U" contendo AuNPs foram testados em soluções de sacarose, para aferição da sensibilidade em função do IR do meio, como descrito no item 4.4.2. Em função dos resultados da sensibilidade em sacarose, o protocolo de funcionalização da superfície das AuNPs com os anticorpos foi aplicado, conforme segue.

O sensor POF em “U” contendo as AuNPs foi imerso em solução de dicloridrato de cistamina ($C_4H_{12}N_2S_2.2HCl$) a 0,1 M (1:100) e mantidos à temperatura ambiente por 12 horas para que se formasse uma camada de grupos amina ($-NH_2$) sobre parte da superfície das AuNPs imobilizadas (Figura 47.a). Em seguida o sensor foi lavado com água ultrapura e PBS para remover o excesso de dicloridrato de cistamina não ligado.

Na terceira etapa, os anticorpos *Anti-T.solium* monoclonal (Ac) (2 µg do anticorpo *Anti-T.solium* monoclonal (Ac), foram ativados pela adição de 1 µL a 50 mg/mL de Sulfo-NHS e 1 µL a 50 mg/mL de EDC (Figura 48.b). A mistura foi mantida a 25 °C por 20 minutos, com agitação em intervalos de 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 µL de BME a 20 mM [77, 223]. Os anticorpos ativados foram então colocados em contato com a área sensível do sensor contendo as NPs (Figura 48.c), seguidos pela incubação por 18 horas a 4 °C. Um esquema das etapas é apresentado na Figura 48.

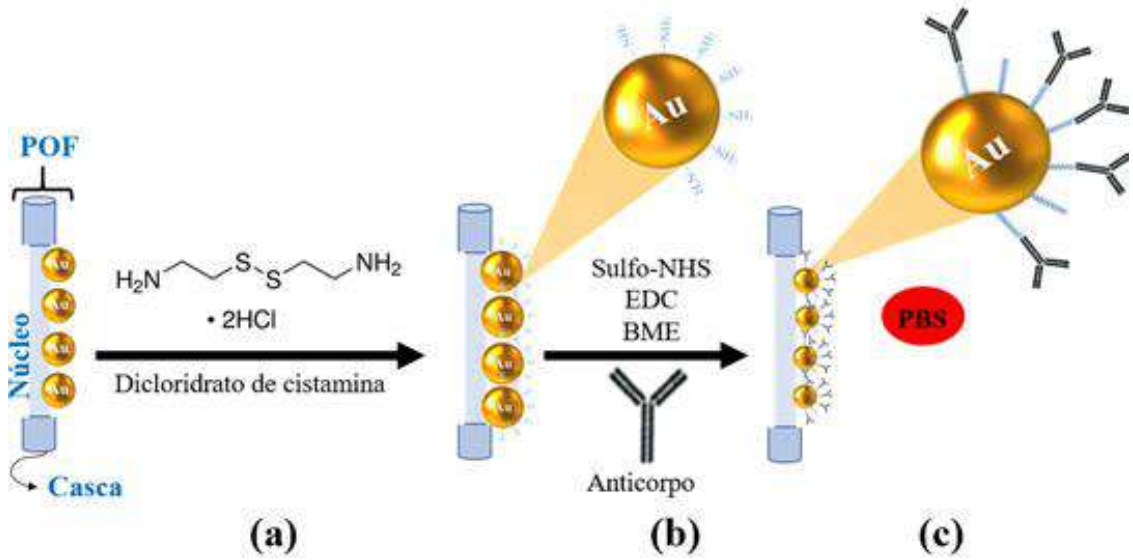


Figura 48- Diagrama do processo de imobilização das suspensões de AuNPs com o anticorpo; (a) adição do dicloridrato de cistamina; (b) ativação do anticorpo; (c) anticorpo ativado colocados em contato com a área sensível do sensor contendo as NPs. Fonte: Adaptado de [228].

Por fim, as sondas foram lavadas em uma solução de PBS por duas vezes para a remoção do anticorpo não ligados, seguidos pela medida do comprimento de onda de transmitância.

As concentrações de antígeno de *T. solium* foram diluídas em PBS (pH 7,2) em seis concentrações diferentes: 0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,6 e 2,0 µg/mL e para o controle negativo foram usadas três diferentes concentrações da bactéria *Escherichia coli* O55 diluída em PBS (pH 7,2). Todos os testes foram programados para serem feitos em triplicatas para a repetibilidade do processo.

4.6.3 ESPECTROSCOPIA UV-Vis - SENSOR 2

Os espectros de transmitância do sensor em “U” com AuNPs foram medidas usando um espectrofotômetro na faixa de 200 a 1000 nm (*CCS200*, *Thorlabs*, *EUA*), uma fonte de luz (*SLS201L, Thorlabs*), um sistema de aquisição de dados (*OceanView*), acopladores para a entrada e saída do sinal dos sensores. As medidas foram feitas no Laboratório de Instrumentação e fotônica (LIF/UFRJ) em mesa óptica com sistema pneumático antivibração e a temperatura ambiente de 25 °C. Na Figura 49 é apresentado o protótipo de teste empregada.

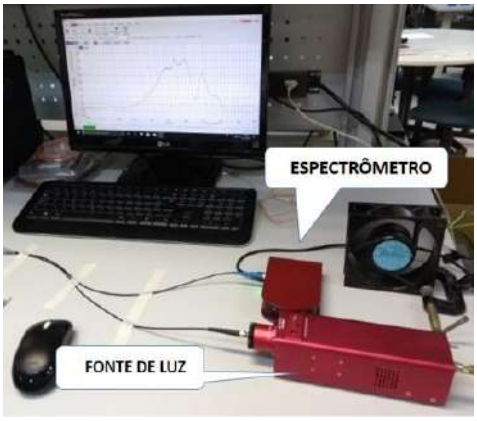


Figura 49 - Configuração optoeletrônica usada para as medidas com o sensor em “U” contendo AuNPs.

5.RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 NANOBIOSSENSOR POR SPR

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO NANOFILME DE OURO

A espessura do nanofilme produzido sobre as lâminas para microscopia foi obtida seguindo a metodologia descrita no item 3.8. A média das medidas realizadas resultaram em uma espessura de 68,2 ± 4 nm para uma deposição de até 20 minutos, correspondente a uma taxa de 3,5 nm/min.

5.1.2 SENSIBILIDADE – SPR

A sensibilidade dos sensores em "U" foi calculada por regressão linear com a medida da transmitância dos sensores sem e com o nanofilme de ouro em função da variação do IR do meio. Os sensores foram testados em diferentes concentrações de sacarose com a seleção de três comprimentos de ondas: 600, 800 e 845 nm. Na Figura 50 é apresentado a curva de sensibilidade do sensor POF em "U" sem ouro.

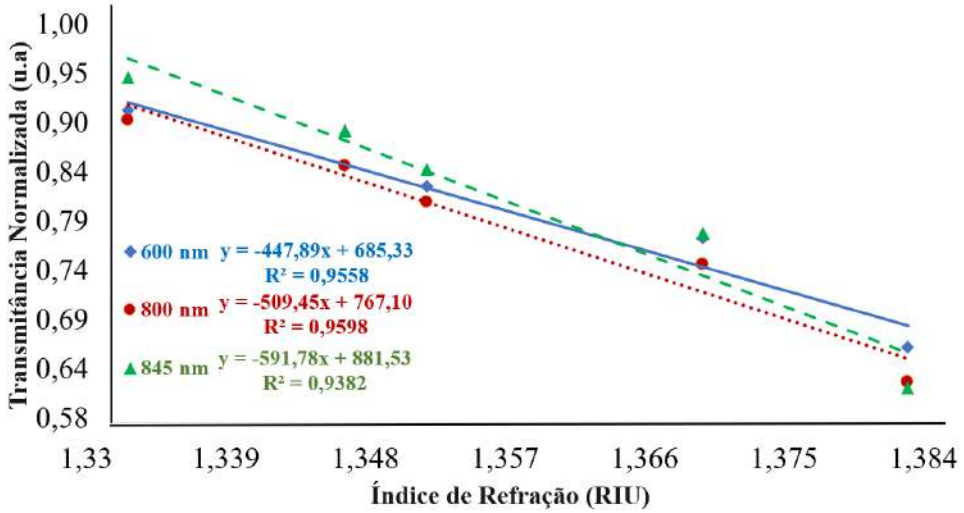


Figura 50- Curva de sensibilidade normalizada dos resultados obtidos do sensor em "U" sem ouro em função da mudança de IR do meio nos comprimentos de onda de 600, 800 e 845 nm.

Os comprimentos de onda de 600, 800 e 845 nm foram selecionadas por apresentar maior sensibilidade para a POF, para o filme fino de ouro, para os testes de imunocaptura e com menores presença de ruídos.

Na Figura 50, à medida que o IR em solução de sacarose aumenta a transmitância diminui. Isso se deve principalmente por que os sensores à fibra óptica em "U" sem revestimento de ouro funcionam pelo princípio da perda de luz na curva e com o aumento do IR do meio, maior será a quantidade de luz perdido para o meio. A análise do

coeficiente angular, a sensibilidade máxima do sensor a POF foi determinada como sendo de: 591,78 %/RIU para o comprimento de onda de 845 nm.

O sensor por SPR apresentou o aumento da intensidade da luz transmitida em função do aumento do IR do meio, comportamento este esperado devido a presença do nanofilme, como mostrados na Figura 51.

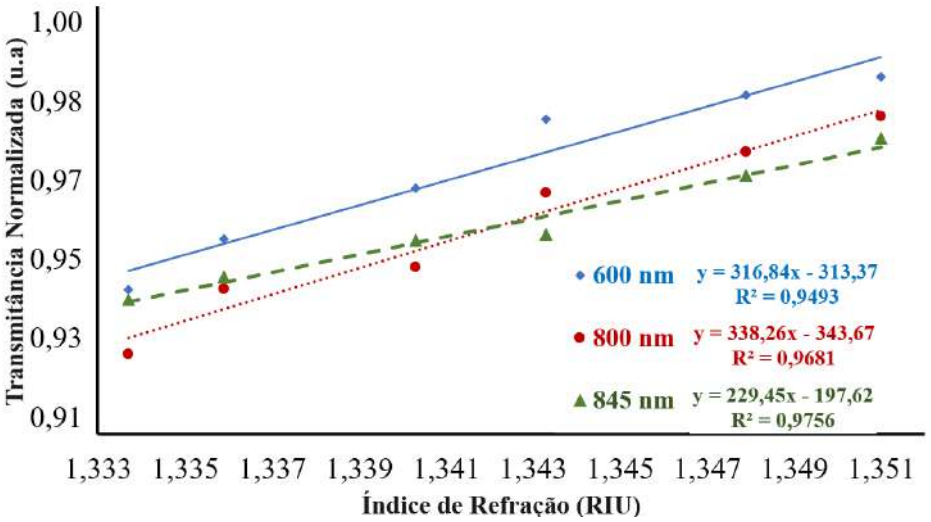


Figura 51 - Curva de sensibilidade normalizada dos resultados obtidos do sensor em forma de "U" com o nanofilme de ouro nos comprimentos de onda de 600, 800 e 845 nm.

Na Figura 51 dentre os comprimentos de onda selecionados, o de 800 nm apresentou sensibilidade máxima da transmitância em função da variação do IR em solução de sacarose como sendo de 338,26 %/RIU. Apesar do sensor sem ouro apresentar maior sensibilidade, para as medidas de IR em sacarose em relação ao sensor com o nanofilme, este último, apresenta o nanofilme como indispensável para o funcionamento do nanobiossensor após a imobilização dos anticorpos. Além disso, promove a seletividade na superfície do nanobiossensor com o uso se menores quantidades de reagentes, menores riscos biológicos e de desestabilização em função da camada nanométrica, resultando na rapidez da execução dos procedimentos. Portanto, esses ensaios em sacarose servem apenas como referência do comportamento do sensor em função das variações do IR do meio como um todo.

5.1.3 DETECÇÃO DA BACTÉRIA *E. coli* - SPR

Os nanobiossensores em "U" construídos segundo protocolo descrito no item 4.4.1e, foram submetidos a ensaios em suspensões da bactéria *Escherichia coli* nas concentrações de: 1,5 x 10^6, 10^4, e 10^3 e 10^2 UFC/mL. Essas concentrações foram escolhidas de modo a resultar em uma curva de sensibilidade e determinar o limite de detecção máximo do sensor para menores concentrações bacterianas.

Os principais resultados encontrados durante os testes com a bactéria, nos comprimentos de onda de maior sensibilidade, são apresentados nos itens a seguir.

O resultado do teste com a concentração de bactérias de 1,5 x 10^6 e 10^4 UFC/mL são vistos na Figura 52.

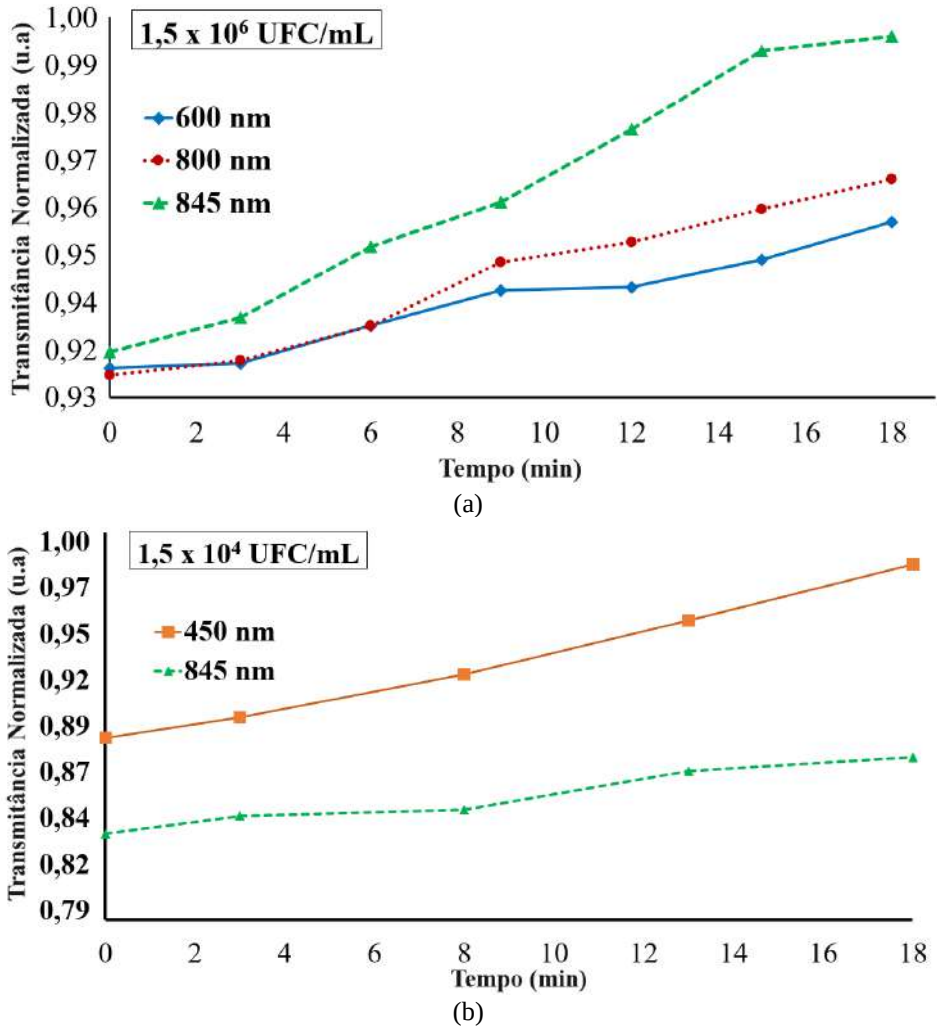


Figura 52 – Resultados dos testes do nanobiossensor por SPR submetido a suspensões bacterianas de: (a) 1,5 x 10^6 UFC/mL de *E. coli;* (b)1,5 x 10^4 UFC/mL de *E. coli.*

No gráfico da Figura 52.a.b, o nanobiossensor apresentou um aumento da transmitância em função do tempo o que comprova a imunocaptura das bactérias. O intervalo para que ocorresse a imunocaptura foi estudo e determinado como sendo de 18 minutos para este tipo de protocolo e nanobiossensor. Após este intervalo o sensor passa a apresentar um comportamento aproximadamente linear em função do tempo.

A taxa de variação IR 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 nanobiossensor em contato com uma concentração de bactérias de 1,5 x 10^3 UFC/mL são vistos na Figura 53.

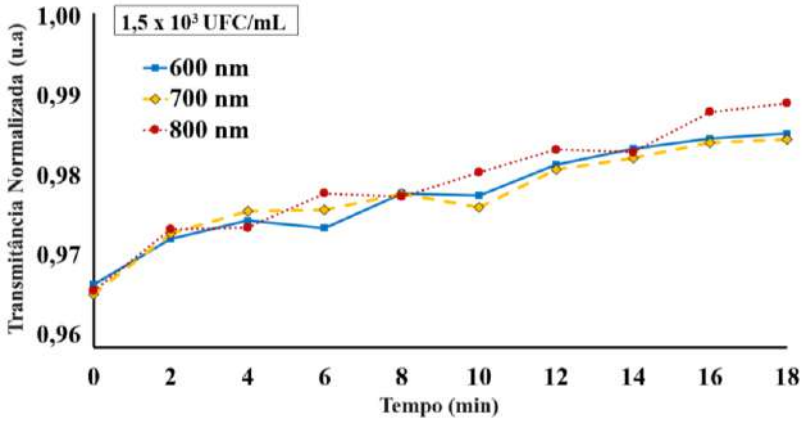


Figura 53 – Resultados dos testes do sensor por SPR medindo uma concentração de 1,5 x10^4 UFC/mL de *E. coli.*

Na Figura 53, percebe-se que o sensor de 70 nm foi capaz de medir concentrações de *E. coli* 1,5 x10^3 UFC/mL. Abaixo dessa concentração não foi possível medir.

5.1.4 TESTES DE SELETIVIDADE PARA A BACTÉRIA *E. coli*

Os nanobiossensores foram imobilizados com anticorpos policlonais. Entretanto este tipo de anticorpo é amplamente reativo com todos os sorotipos antigênicos somáticos e capsulares (O e K) e, portanto, pode reagir de forma cruzada com *enterobacteriaceae* relacionadas, ou seja, com bactérias gram-negativas. Sabendo disso, os sensores foram testados em suspensões bacterianas de *Salmonella entérica serovar paratyphi* e *Bacillus subtilis.* Os resultados dos testes estão apresentados nas Figura 54 segundo o comprimento de onda de maior sensibilidade.

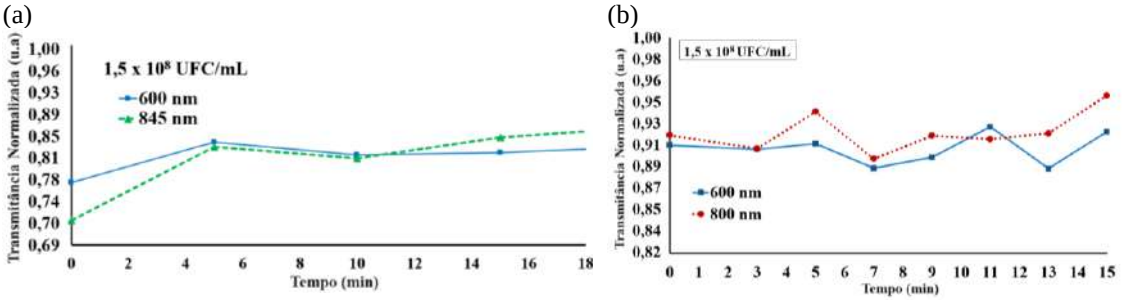


Figura 54 – Nanobiossensores imobilizado com anticorpos de *E. coli* e imerso em suspensão da bactéria (a) *Salmonella* a 1,5 x 10^8 UFC/mL e (b) *Bacillus subtilis* 1,5 x 10^8 UFC/mL.

Na Figura 54.a, o nanobiossensor imobilizado com anticorpo da bactéria *E. coli* foi testado em suspensão da bactéria *Salmonella entérica serovar paratyphi* com uma concentração de 1,5 x 10^8 UFC/mL. Para os dois comprimentos de onda: 600 e 845 nm, o sensor detectou a presença de uma bactéria diferente da *E. coli*, o que é indesejável, mesmo para uma alta concentração. Entretanto a bactéria *Salmonella* integra o grupo das

enterobacteriaceae, e neste caso recomenda-se o uso de anticorpos monoclonais *anti-E. coli* para uma maior confiabilidade e seletividade.

Na Figura 54.b, o nanobiossensor foi testado em suspensão da bactéria *Bacillus subtilis* com uma concentração de $1{,}5x10^8$ UFC/mL. Os resultados mostram que o nanobiossensor permaneceu estável com um delta de variação dentro da taxa de dispersão do sensor o que comprova que os anticorpos não capturaram este tipo de bactéria classificada como gram-positivas.

5.1.5 CARACTERIZAÇÃO - SPR

A estimativa da área de cobertura dos nanobiossensores após a imunocaptura pelas bactérias foi obtida através da metodologia descrita no item 3.8.2

Os resultados obtidos por Microscopia Óptica da adesão das bactérias sobre a superfície do nanobiossensor após o contato com a suspensão da bactéria *E. coli* na concentração de 1,5 $x10^8$ UFC/mL são vistas na Figura 55.

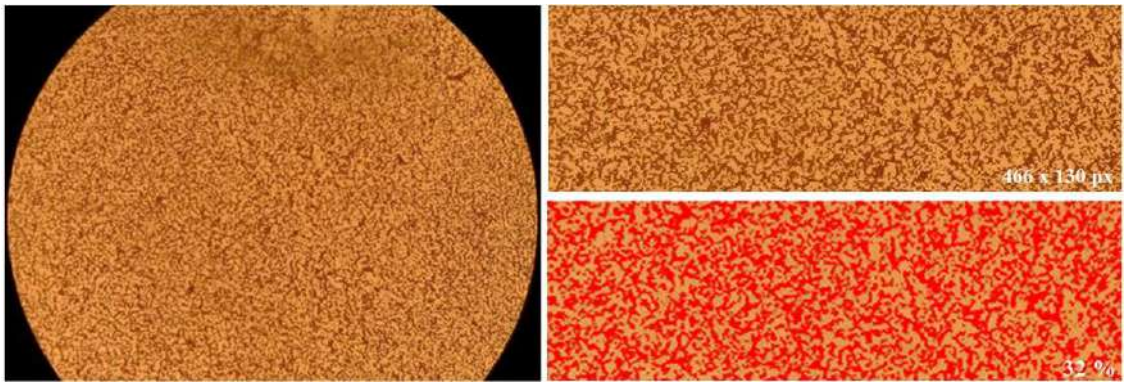


Figura 55 – Imagem de microscópio óptico (com imersão da amostra e ampliada em 1000 vezes) da adesão das bactérias *E. coli* em uma lâmina de vidro contendo o nanofilme imobilizado e após o contato com a suspensão da bactéria *E. coli* na concentração de 1,5 x 10^8 UFC/mL e coloração em corante safranina.

A estimativa da área de adesão das bactérias sobre a superfície do nanobiossensor foi calculada usando o s*oftware ImageJ* e estimada em aproximadamente 32 %.

A visualização da bactéria aderida à superfície do nanobiossensor foi feita através do MEV. As micrografias obtidas são vistas na Figura 56.

(a) (b)

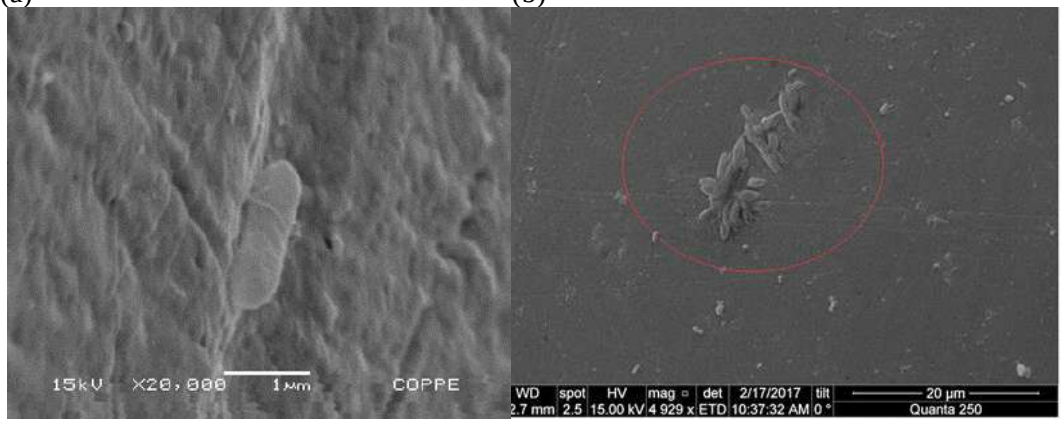


Figura 56 –Micrografias das bactérias *E. coli* (a) sobre a superfície do nanobiossensor em "U" em MEV do CENABIO/UFRJ ampliada em 20.000 vezes; (b) Bactérias *E. coli* aglomeradas sobre a superfície do nanobiossensor.

As micrografias obtidas, na Figura 56 apresentaram as imagens das bactérias dispersas e/ou em ponto isolados sobre a superfície do nanobiossensor. Isso ocorreu devido ao processo de tratamento em ponto crítico de controle dos nanobiossensores antes da visualização, o que resultou na destruição e degradação de parte da superfície da fibra óptica e consequentemente, de parte das bactérias que estavam aderidas à superfície.

5.2 SENSOR POR LSPR – SENSOR 1

5.2.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

A síntese das AuNPs pelos métodos de *Turkevich* e MCMS levam à formação de uma suspensão coloidal de NPs com um único pico de absorção, como podem ser vistos na Figura 57.

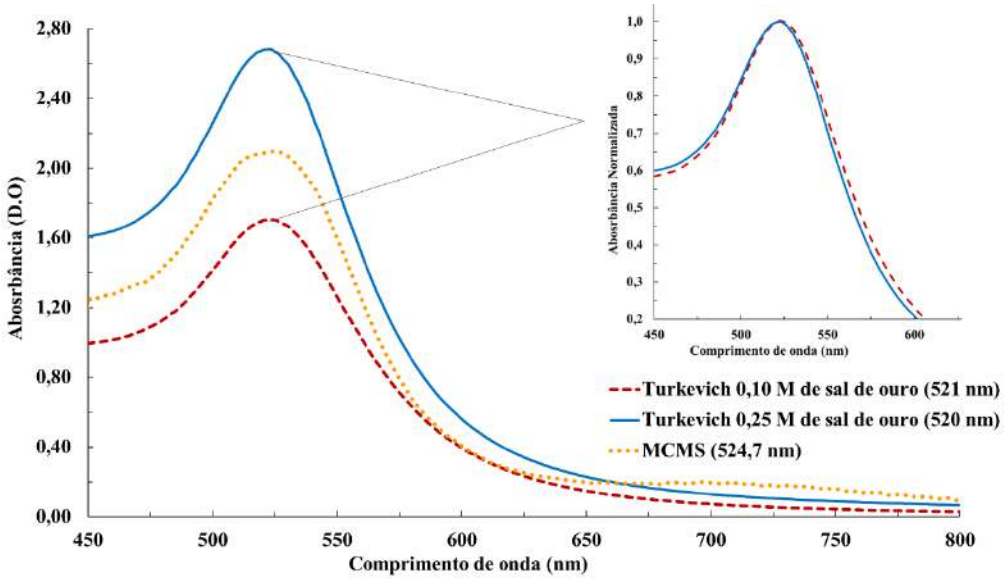


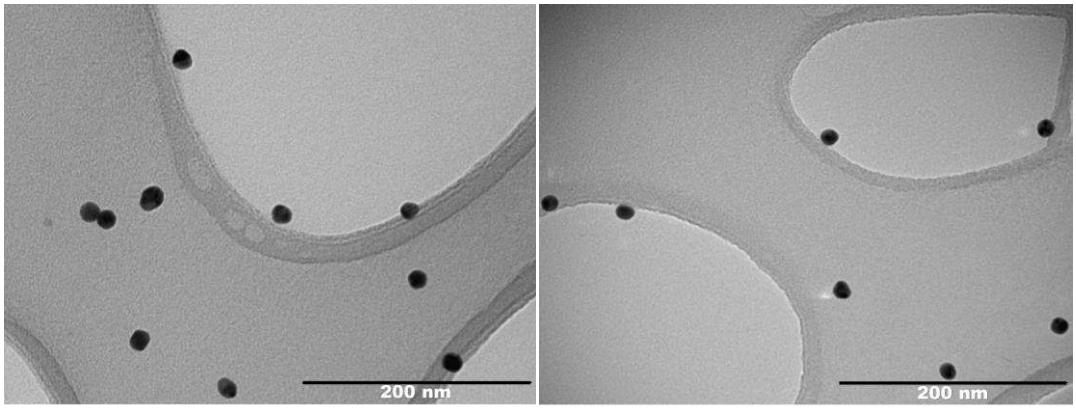
Figura 57 -Espectro de absorção máximo das AuNPs obtidas pelo método de *Turkevich* a 0,1 M e 0,25 M de sal de ouro e pelo MCMS.

O comprimento de onda de absorção máxima das AuNPs sintetizadas pelo método de *Turkevich* nas concentrações de 0,1 e 0,25 M de sal de ouro apresentaram picos de 521 e 520 nm respectivamente. Apesar da pequena diferença de comprimento de onda máximo entre as concentrações, a intensidade do pico do espectro de UV-Vis (absorbância), observadas na Figura 57, foram ligeiramente diferentes. Isso está associado às diferentes concentrações de AuNPs [230] presentes na suspensão coloidal. Nesse sentido, a síntese pelo método de *Turkevich* utilizando 0,25 M de sal de ouro apresentou maior concentração das AuNPs na suspensão coloidal, em comparação à síntese utilizando 0,1 M de sal de ouro.

As AuNPs sintetizadas pelo método MCMS apresentaram pico de absorção de 524,7 nm e banda de absorbância mais larga, de modo a indicar que essas NPs apresentam tamanhos maiores que as de *Turkevich* e/ou estão polidispersas [164].

O comprimento de onda de absorção máxima das AuNPs obtidos por ambos os métodos de síntese ficaram na faixa característica entre 500-600 nm variando de acordo com o tamanho e a forma das AuNPs [231]. À vista disso, para tamanhos diferentes de AuNPs, temos picos de absorção ligeiramente diferentes. Assim sendo, para nanopartículas menores o comprimento de onda do pico de absorção será menor, de modo que, à medida que o tamanho da AuNP diminui, observamos um desvio para o comprimento de onda do *blueshift* e à medida que o tamanho da AuNPs aumenta, um desvio para o comprimento de onda correspondente ao *redshift*.

As propriedades morfológicas das NPs sintetizadas por *Turkevich* foram observadas por meio da caracterização em STEM, cujas micrografias são mostradas na Figura 58.



(a) (b)

Figura 58 - Micrografias das AuNPs sintetizadas pelo método de *Turkevich* em (a) 0,10 M e (b) 0,25 M de sal de ouro.

Na Figura 58.a, as AuNPs sintetizadas na concentração de 0,1 M de sal de ouro apresentaram diâmetros de 15,7 ± 1,6 nm e com 0,25 M de sal de ouro, Figura 58.b,

apresentaram diâmetro de 14,6 ± 2,3 nm com formato aproximadamente esférico. Essas AuNPs apresentaram diâmetros muito próximos, com distribuição morfológica semelhantes.

A variação na concentração de sal de ouro para uma mesma concentração de agente redutor que também é estabilizador, produziu uma variação na taxa de adsorção de Au^{+} durante a fase de nucleação, e como consequência no controle da uniformidade das nanopartículas e na polidispersidade [232].

A polidispersidade normalmente é observada em suspensões de AuNPs sintetizadas com o agente redutor citrato de sódio, produzindo NPs com alto grau de elipticidade, devido à redução diferencial nas partículas, que podem ser reduzidas usando o método de crescimento por semeadura [55, 233] mesmo aumentando a concentração do agente redutor ou agente precursor como foi feito. Segundo testes realizados por CHOW e ZUKOSKI (1994) [233] ao manter a concentração de citrato de sódio fixa e variar a do sal de ouro, constatou-se que o tamanho da partícula pouco variou para uma ampla faixa de concentrações de sal de ouro investigadas. Deste modo, torna-se inviável a produção de AuNPs maiores que 20 nm por este método [149].

As AuNPs sintetizadas por MCMS foram observadas por meio da caracterização em SEM e as micrografias são mostradas na Figura 59.

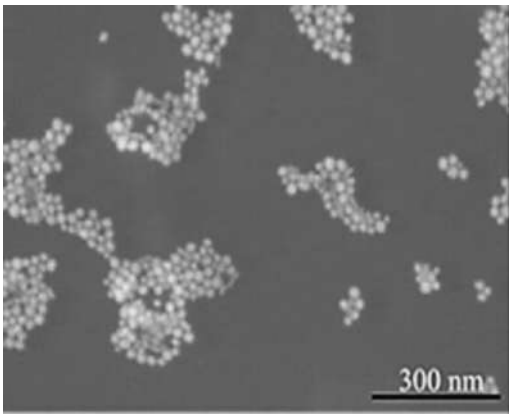


Figura 59 - Micrografias em SEM das AuNPs sintetizadas pelo método MCMS.

Na Figura 59, as AuNPs apresentaram diâmetros de 20,5 ± 3,1 nm o que está em conformidade com os diâmetros reportados na literatura [235]. Também nesta micrografia as NPs apresentaram-se aglomeradas, isso se deve à remoção do excesso de CTAB e concentração da suspensão coloidal antes da caracterização, para melhor visualização. O CTAB é o responsável pelo direcionamento do crescimento das NPs, que a depender da concentração podem adquirir formato de nanobastões ou de nanoesferas.

A sensibilidade das suspensões de AuNPs por *Turkevich* e por MCMS em função da variação do IR do meio circulante foram medidas através da mistura em diferentes concentrações de sacarose produzindo variações na faixa de 1,33 a 1,40 RIU. A evolução da posição do pico máximo de absorbância do comprimento de onda (LSPR) com o IR do meio circundante são apresentados na Figura 60.

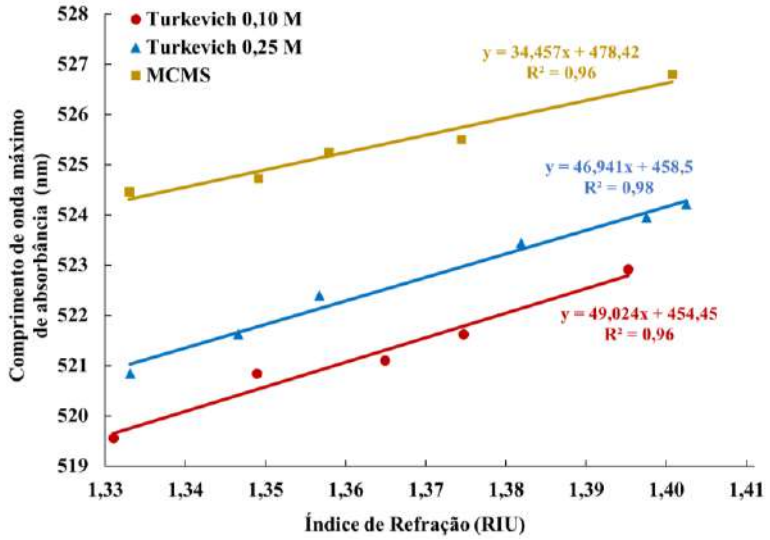


Figura 60 -Comprimento de onda máximo de absorbância versus índices de refração do meio circundante das suspensões de nanopartículas de ouro (AuNPs) sintetizadas por *Turkevich* a 0,1 M de sal de ouro (●); a 0,25 M de sal de ouro (▲); e por MCMS (■).

O comprimento de onda de ressonância das AuNPs sintetizadas por *Turkevich* a 0,1 M apresentaram deslocamento de 520 para 523 nm e na concentração de 0,25 M o deslocamento foi de 521 para 524 nm. Para as AuNPs sintetizadas pelo MCMS, o comprimento de onda de ressonância passou de 524 para 527 nm como é mostrado na Figura 60. Para todas essas três sínteses, o comprimento de onda de ressonância das AuNPs apresentou um desvio para o *redshift* à medida que o IR do meio circundante aumentou.

A inclinação da reta representa a sensibilidade do nanossensor em função da variação de IR. As AuNPs sintetizadas por *Turkevich* mostraram uma sensibilidade de 49 nm/RIU (0,1 M de sal de ouro) e 47 nm/RIU (0,25 M de sal de ouro). A proximidade desses valores se deve à similaridade em tamanho e forma das NPs obtidas pelo método de *Turkevich*. Para AuNPs pelo MCMS foi calculada uma sensibilidade de 34 nm/RIU.

A sensibilidade do nanobiossensor em função das variações de IR não depende apenas do tamanho e forma, mas também das interações e da separação interpartícula [221, 236]. Apesar do maior tamanho das nanopartículas obtidas por MCMS, um menor valor de sensibilidade foi observado para medidas de IR. Este efeito pode ser atribuído à presença do estabilizante CTAB na suspensão coloidal, que em excesso, além de

proporcionar uma camada protetora para a NPs, promove a repulsão eletrostática entre as NPs [235]. Além disso, quando os plásmons são excitados, resultam em várias frequências de ressonância plasmônica sobrepostas o que pode diminuir a sensibilidade do nanossensor na medida do IR do meio [221]. No entanto, ao realizar os protocolos de funcionalização com o anticorpo à superfície das AuNPs, esses efeitos são drasticamente reduzidos.

O potencial zeta, foi usado como parâmetro para indicar a estabilidade das suspensões coloidais. A amplitude em *volts* do potencial, especifica a repulsão eletrostática entre as partículas em dispersão e a resistência à agregação.

Para valores maiores que ± 40 mV (positivo ou negativo), há boa estabilidade, enquanto para valores entre ± 30 mV e ± 10 mV, há baixa estabilidade. Para valores menores que ± 10 mV haverá rápida coagulação e floculação [174, 237] como apresentado no item 3.8. Os resultados dos potenciais zeta das suspensões de AuNPs sintetizadas são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da medida da estabilidade da suspenção coloidal de AuNPs.

AuNP	Potencial Zeta (mV)	Comportamento de estabilidade dos coloides
Turkevich	- 44,2 ± 5,3	Boa estabilidade
MCMS	+ 46,6 ± 2,7	

Os valores dos potenciais zeta para a síntese de *Turkevick* foram de aproximadamente - 44,2 ± 5,3 mV para ambas as concentrações de sal de ouro. Esses valores estão em acordo com os valores reportados na literatura de -43 ± 5 mV, independentemente da concentração de AuNPs presente na suspensão coloidal [238].

O sinal negativo do potencial indica que a ligação de íons citrato na superfície das NPs ocorre eletrostaticamente por meio de átomos de oxigênio negativos de grupos carboxílicos (oxiânions) nas extremidades da molécula de citrato. Já a síntese pelo MCMS apresentou Potencial Zeta de +46,6 ± 2,7 mV indicativos de boa estabilidade. O sinal positivo do potencial confirma que as AuNPs estão estabilizadas e carregadas positivamente, devido ao uso do surfactante catiônico CTAB.

5.2.2 FUNCIONALIZAÇÃO DAS AuNPs E DETECÇÃO DE *T. solium*

O processo de aminação substitui o estabilizante presente na superfície das AuNPs sintetizadas por grupos tiolados. Além de fornecer o grupo amina necessário para a ligação com o anticorpo, a etapa de aminação também ajuda a prevenir a agregação das NPs na suspensão.

Os grupos tióis provenientes da cistamina (Cys) possuem alta afinidade com a superfície do ouro e podem deslocar o citrato ou o revestimento CTAB, permitindo a formação de fortes interações e superfícies orgânicas bem definidas, com variáveis químicas e bioquímicas, funcionalidades estas que determinam as propriedades da interface exposta ao ambiente externo [239].

Dependendo do revestimento, temperatura e concentração, as AuNPs reagem de maneira diferente na presença da cistamina durante o processo de aminação. Neste sentido, foram testados os volumes de 5, 10, 15 e 20 µL de dicloridrato de cistamina a 0,1 M (1:100) conforme descrito no item 4.4.3a. Os resultados da aminação para a síntese de AuNPs por *Turkevich* nas concentrações de 0,1 e 0,25 M são apresentados na Figura 61.

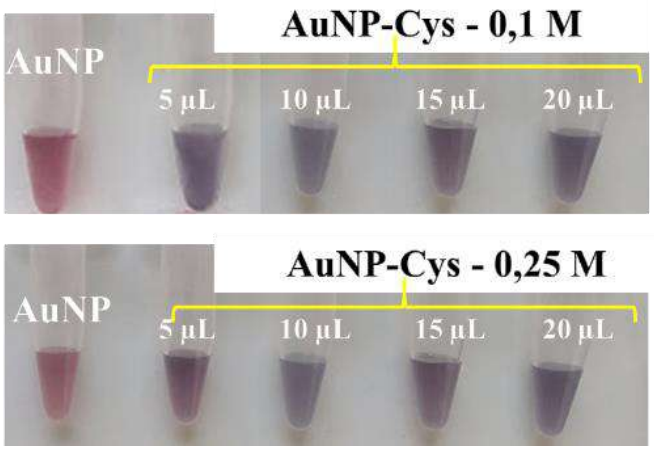


Figura 61 – Suspensões de AuNPs antes e após a aminação por *Turkevick* a 0,1 M e 0,25 M.

As suspensões de AuNPs sintetizadas por *Turkevich,* após a aminação mostraram a desestabilização de todas as suspensões de AuNPs contendo dicloridrato de cistamina, com alteração da cor, presença de precipitados e/ou aglomerados, independentemente de a concentração do sal de ouro ser de 0,1 ou de 0,25 M.

A desestabilização pode estar relacionada a múltiplos cruzamentos eletrostáticos ou que a amina do cloridrato de cistamina fica desprotonada nas condições avaliadas, levando a uma perda de repulsão eletrostática entre as AuNPs, pois forma uma camada passivadora na superfície das NPs [240, 241]. Por outro lado, AuNPs sintetizadas pelo MCMS apresentaram boa estabilidade durante a etapa de aminação para todas as concentrações avaliadas, com ausência de precipitados, aglomerados e variações abruptas de cores como podem ser vistos na Figura 62.

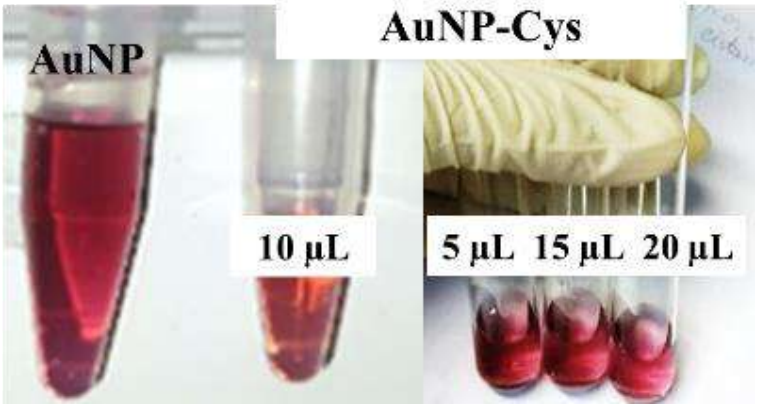


Figura 62 – Suspensão de AuNPs antes e após a aminação pelo MCMS

Considerando a boa estabilidade química e física das AuNPs por MCMS frente à modificação da superfície, o espectro de absorbância máximo foi medido. O deslocamento (*blueshift*) promovido pela remoção do estabilizante CTAB na superfície das AuNPs foi satisfatoriamente substituída por grupos aminas fornecidas pela cistamina, como podem ser comprovadas no espectro da Figura 63.

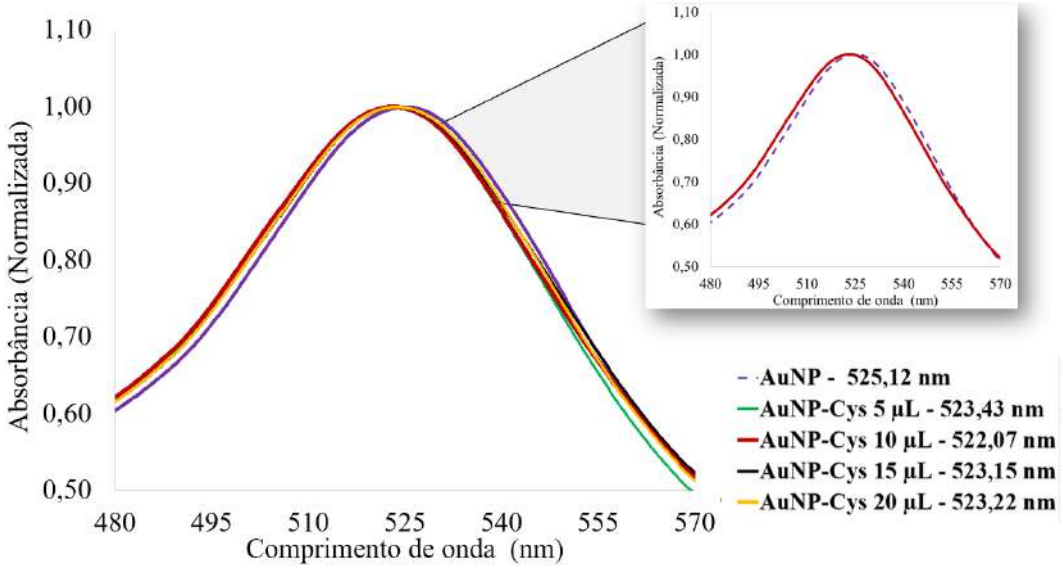


Figura 63 – O deslocamento do pico de absorção em cada concentração de aminação nas AuNPs por MCMS. Em destaque para o pico de absorção máximo no volume de 10 uL.

Tendo em vista, que as AuNPs sintetizadas pelo MCMS apresentaram melhores resultados nos ensaios aminação, esta síntese foi, portanto, selecionada para a detecção do antígeno de *T. solium*. O volume de 10 uL de solução de dicloridrato de cistamina a 0,1 M foi escolhido como concentração adequada para a aminação por apresentar o maior delta de deslocamento (*blueshift*), como detalhados na Tabela 6.

Tabela 6. Comprimentos de onda de LSPR e o delta dos deslocamentos das AuNPs MCMS aminadas em dicloridrato de cistamina a 0,1 M.

	AuNPs	**AuNPs-Cys (0,1 M)**			
		5 µL	10 µL	15 µL	20 µL
Absorbância Máxima ± 2 (nm)	525,12 nm	523,43 nm	522,07 nm	523,15 nm	523,22 nm
Delta de Absorbância Máxima (nm)	0	- 1,69 nm	-3,05 nm	-1,97 nm	-1,9 nm

Considerando o efeito combinado do IR local do meio circundante, do revestimento em torno das NPs, da transferência de carga entre as NPs e o solvente presente no meio [54] o efeito combinado dessas variáveis resultou em um *blueshift* do espectro de absorbância para a AuNPs-Cys e um *redshift* para AuNPs, semelhante ao observado por [242].

5.2.3 TESTE DE ESTABILIDADE E DA VARIABILIDADE DO PROCESSO

Após os testes de aminação, a escolha do método de síntese e a concentração ideal para a aminação, as AuNPs por MCMS foram armazenadas e monitorados durante nove semanas (56 dias) para verificação da estabilidade em função do tempo de armazenamento. Os resultados dos ensaios são apresentados na Figura 64.

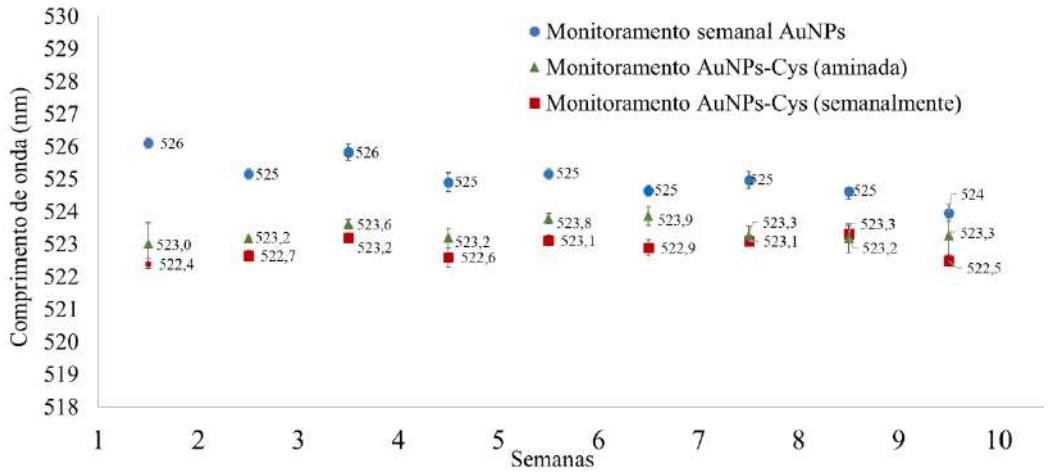


Figura 64 - Monitoramento semanal da estabilidade das (●) AuNPs, (▲) AuNPs-Cys aminadas e (■) AuNPs-Cys aminadas semanalmente a 10 uL (0,1 M).

Na Figura 64 as AuNPs sintetizadas apresentaram capacidade para serem armazenadas sem perda de estabilidade por até 56 dias quando revestidas em CTAB. Em função do tempo de armazenamento e do deslocamento espectral as AuNPs-Cys já aminadas e aminadas semanalmente foram avaliadas. A tabela 7 apresenta os deslocamentos do LSPR semanal.

Tabela 7. Pico de comprimentos de onda de absorbância máximo e o delta de deslocamento das AuNPs-Cys em função do tempo de armazenamento.

Absorbância Máxima ± 2 (nm)			
Semana	**Pico máximo de comprimento de onda das AuNPs**	**Delta AuNPs-Cys**	**Delta AuNPs-Cys semanalmente**
1º	526 nm	-3,0 nm	-3,6 nm
2º	525 nm	-1,8 nm	-2,3 nm
3º	526 nm	-2,4 nm	-2,8 nm
4º	525 nm	-1,8 nm	-2,4 nm
5º	525 nm	-1,2 nm	-1,9 nm
6º	525 nm	-1,1 nm	-2,1 nm
7º	525 nm	-1,7 nm	-1,9 nm
8º	525 nm	-1,8 nm	-1,7 nm
9º	524 nm	-0,7 nm	-1,5 nm

As AuNPs-Cys aminadas e monitoradas semanalmente apresentaram estáveis por aproximadamente três semanas, após isso houve uma redução do delta de deslocamento em relação as AuNPs de origem. Segundo KAUR e CHUDASAMA (2018) [243] as suspensões de NPs não devem ser armazenados em sua solução de crescimento (CTAB) porque eles continuam a envelhecer, levando a um deslocamento progressivo para o azul de sua banda LSPR. Portanto uma dispersão de AuNPs pobre em CTAB e com maiores quantidades de água pode permitir preservar as propriedades dos AuNPs por um período maior [139, 243].

Apesar da purificação das suspensões de AuNPs após a síntese e remoção do excesso de CTAB, esta etapa mostrou ser insuficiente para evitar ou retardar o envelhecimento das AuNPs. Portanto, neste estudo foram adotadas como protocolo o uso das suspensões de AuNPs sintetizadas com um tempo máximo de duas semanas, e aminadas horas antes do início da realização do protocolo de imobilização com os anticorpos.

Uma vez que os testes em cubetas utilizam amostras diferentes, foi necessário verificar a variabilidade do processo e a capacidade de repetição dos resultados. Para tanto, foram realizadas medidas em dez amostras de suspensão de AuNPs de uma mesma síntese. As curvas foram ajustadas pelo *software Peakfit* a fim de facilitar o cálculo do valor do comprimento de onda de absorção máximo. Os resultados de cada medida estão apresentados na Tabela 8 com os valores da média e do desvio padrão.

Tabela 8. Comprimento de onda do pico de absorção máximo de cada amostra da síntese de AuNPs pelo MCMS.

Amostras da síntese de AuNP -MCMS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{X}$	S
Pico de absorção (nm)	526,0	524,2	525,3	525,0	525,5	525,0	525,3	524,2	524,7	525,3	**525,0**	0,55

A média das medidas da suspensão na cubeta foram de 525 nm com um desvio padrão de 0,55, o que indica baixa variabilidade do processo e boa capacidade de repetição.

5.2.4 CONJUGAÇÃO COM ANTICORPOS E TESTES COM *T. solium*

Na última etapa da imobilização, as AuNPs-Cys foram conjugadas a anticorpos (Ac) ativados de *T. solium* permitindo um acoplamento do Ac às nanopartículas. Este processo ostentou estabilidade e deslocamento do pico de absorbância máximo tendendo para o *redshift* em função do aumento do peso molecular devido à estrutura proteica acoplada a NPs, conforme mostrado na Figura 65 (AuNPs-Ac). Um outro teste foi realizado para verificar a capacidade do nanobiossensor proposto em detectar antígenos (Ag) de *T. solium* presentes em uma suspensão coloidal a 2 µg/mL. O resultado é apresentado na Figura 65 identificado por AuNP-Ac-Ag 2µg/mL.

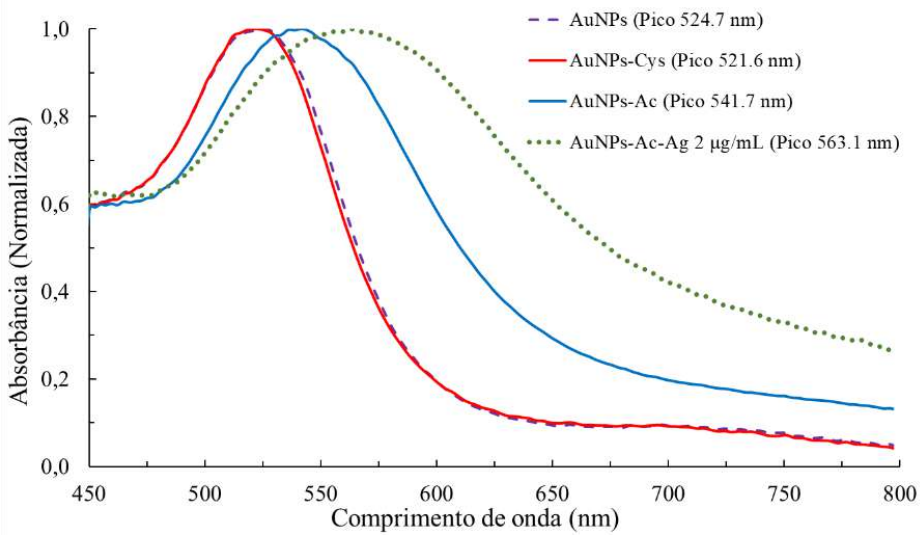


Figura 65 - O deslocamento do pico de absorção em cada etapa do protocolo de imobilização e quando em contato com o antígeno de *T. solium.*

Na Figura 65 é possível notar um *redshift* de 21,4 nm, indicando a reação de imunocaptura Ac/Ag.

Em todas as etapas do processo de imobilização e do teste de detecção de *T. solium*, o Potencial Zeta foi medido. A Tabela 9 mostra resumidamente o pico do comprimento de onda da LSPR e o respectivo deslocamento para todas as etapas da imobilização, bem

como para o nanobiossensor de *T. solium* e o Potencial Zeta em cada fase. Observe que as suspensões de AuNPs apresentaram valores de Potencial Zeta superiores a +20 mV em todas as etapas, garantindo a estabilidade do nanobiossensor, que é a principal preocupação para aplicação biomédica. A estabilidade do nanobiossensor também foi confirmada pela espectroscopia de absorção de UV-vis (Figura.65), que permitiu o monitoramento da interação de substratos ligantes com AuNPs [244].

Tabela 9. Comprimentos de onda de LSPR, deslocamentos e Potencial Zeta durante as etapas de funcionalização e após o contato com a *T. solium*.

	Etapas de funcionalização			
	AuNPs	**AuNPs-Cys**	**AuNPs-Ac**	**AuNPs-Ac-Ag**
Absorbância Máxima ± 2 (nm)	524,7 nm	521,6 nm	541,7 nm	563,1 nm
Delta de Absorbância Máxima (nm)	0	- 3,1 nm	+ 20,1 nm	+ 21,4 nm
Potencial Zeta ± 2,7 (mV)	+ 46,6 mV	+ 40 mV	+ 29 mV	+ 26,1 mV

Com base nesses resultados, é possível indicar que o nanobiossensor coloidal por LSPR desenvolvido é capaz de detectar o parasita *T. solium* em amostras clínicas.

5.2.5 TEMPO DE RESPOSTA, SELETIVIDADE E SENSIBILIDADE

Para verificar o tempo de detecção do nanobiossensor, para captura de *T. solium* Ag com 2 µg/mL foi medido em três intervalos de tempo diferentes como podem ser vistos na Figura 66.

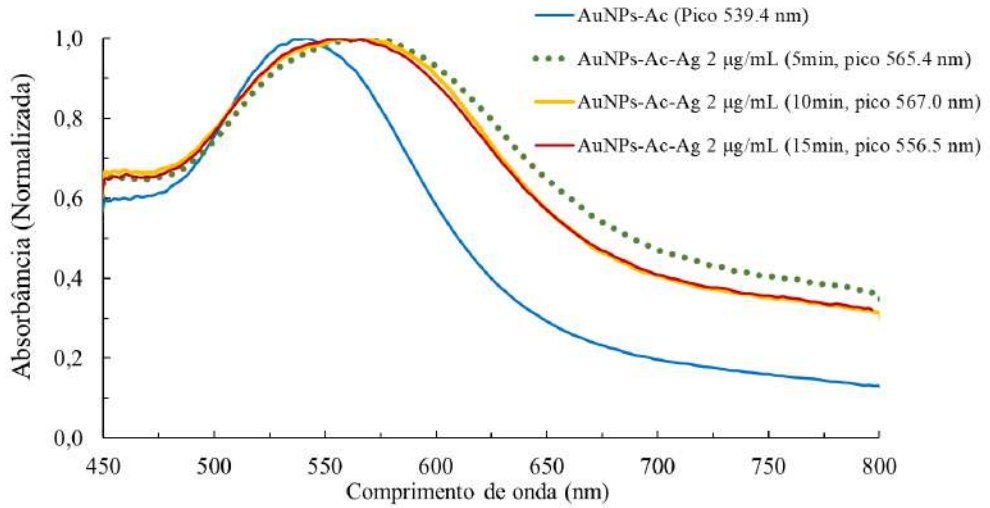


Figura 66 - Espectros de absorbância de UV-Vis da captura de 2 µg/mL de Ag de *T. solium* pelo nanobiossensor em um tempo de contato de 5, 10 e 15 minutos.

Os espectros de absorbância de UV-Vis, como vistos na Figura 66, de Ag de *T. solium* foi detectado após 5 minutos com um desvio para o *redshift* em torno de 26 nm. Entre 10 e 15 minutos, não houve nenhum deslocamento relevante adicional perceptível do pico de comprimento de onda de absorção.

Esse tempo de detecção de cinco minutos é compatível com o trabalho de Oliveira J.P., *et al*., (2019) [245] que relataram cinco minutos como tempo de incubação dos bioconjugados com o antígeno 17ß-estradiol, detectado pela técnica de LSPR.

Outros trabalhos, também baseados em nanobiossensores por LSPR, mostraram tempos de detecção de antígenos mais longos, como 20 minutos para detectar *Trypanosoma cruzi* [75] e 30 minutos para detectar *Escherichia. coli* [224, 246]. Portanto, o tempo de detecção de cinco minutos obtido neste trabalho pode ser considerado como uma detecção rápida, consistindo em uma vantagem importante quando comparado ao ensaio imunoenzimático (ELISA), uma técnica padrão para o diagnóstico de NCC, e que leva horas para serem concluídas [247, 248].

A seletividade do nanobiossensor desenvolvido foi investigada usando outro agente biológico como controle negativo. Para este propósito, os conjugados AuNPs-Ac foram colocados em contato com suspensões das bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) em PBS com várias concentrações, como 1,5 x10^1, x10^3 e x10^7 UFC em condições experimentais semelhantes. A Figura 67 mostra os espectros LSPR para cada concentração, confirmando que não foram observadas alterações nos espectros de absorbância, indicando que a bactéria *E. coli* não foi capturada por anticorpos de *T. solium*.

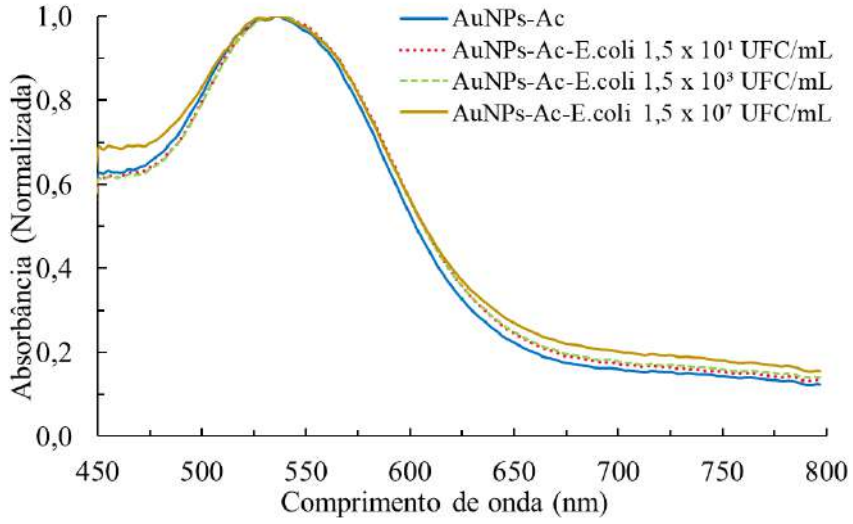


Figura 67 -Espectros de absorbância de conjugados de anticorpos AuNP-Ac após contato com diferentes concentrações de *E. coli*, mostrando nenhum deslocamento do espectro de absorção LSPR.

O próximo teste foi a avaliação da sensibilidade do nanobiossensor proposto. Para estas várias concentrações de Ag de *T. solium* na faixa de 0,1 a 2,0 µg/mL foram aplicadas ao nanobiossensor, como mostrados na Figura 68.

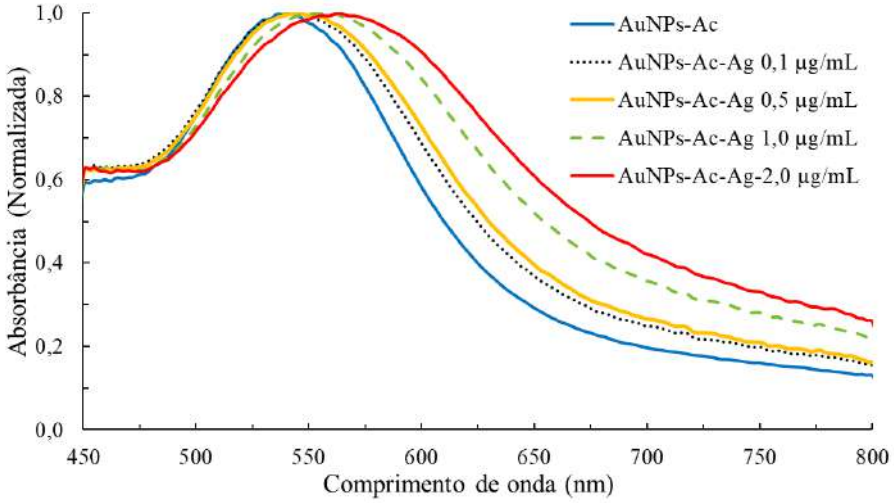


Figura 68 - Espectros de absorbância de UV-Vis de conjugados de anticorpos AuNP-Ac após adição de diferentes concentrações de Ag de *T. solium*.

Na Figura 68, o deslocamento do pico LSPR aumentou com a quantidade de antígeno ligados às AuNPs funcionalizadas.

Na Figura 69 é mostrado uma curva dose-resposta exibindo uma correlação *sigmoidal*, como mostrado pela linha pontilhada. A mudança relativa da resposta ao deslocamento concorda com vários autores que usaram LSPR para detecção de biotina [236], estreptavidina [249], hepatite B [250], e biomarcadores de LDL-HDL [251]. Também as barras de erro representaram o desvio padrão em três medições independentes. O coeficiente de variação (% CV) obtido para todas as concentrações avaliadas foi inferior a 10 %, indicando uma precisão satisfatória para detecção de Ag de *T. solium*, semelhante ao relatado por KIM, J. *et al.*, (2018) [252] para detecção do antígeno da hepatite B.

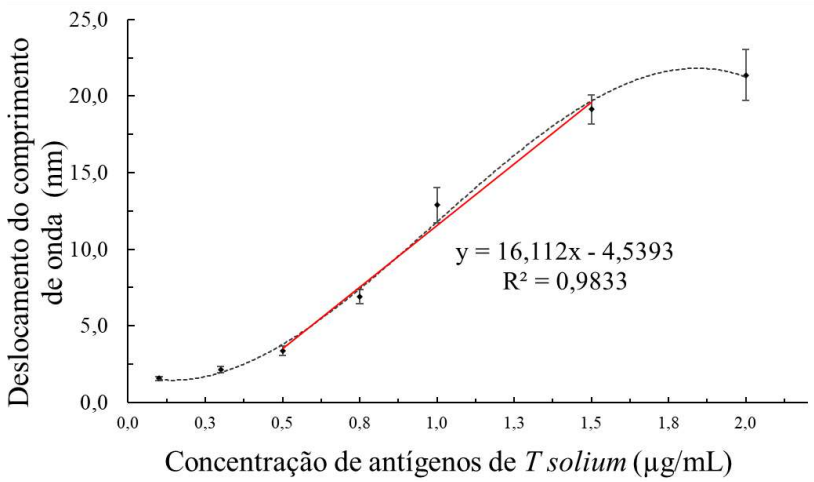


Figura 69 - Curva de dose-resposta do *redshift* do nanobiossensor em função das concentrações de Ag de *T. solium*.

Conforme apresentado na Figura 69, quando os antígenos estavam presentes em concentrações mais baixas, um pequeno deslocamento para o *redshift* foi observado, implicando em um estado insaturado. Também é possível notar que na faixa de 0,5 a 1,5 µg/mL de Ag de *T. solium*, os *redshifts* aumentaram progressivamente em relação à concentração de Ag. Os últimos *redshifts* mostraram uma pequena variação nas concentrações mais altas, indicando um estado de saturação.

A evolução dos *redshifts* pode ser interpretada como comportamento cinético para a ligação em estado estacionário, conforme apresentado por [253]. A menor resposta significativa foi a 0,1 µg/mL de Ag de *T. solium*, já no estado insaturado, indicando que o limite de detecção do nanobiossensor é superior a 0,1 µg/mL de Ag de *T. solium*. Este resultado é satisfatório uma vez que estudos relatam que a concentração de antígenos microbianos no sangue humano pode variar de 0,04 a 2 µg/mL nos primeiros dias de uma infecção, podendo chegar até 50 µg/mL segundo Alcon, S., *et al.*, (2002) [255].

Estudos de um ensaio imunoenzimático indireto (I-ELISA) realizados por BIONDI, G.F., *et al.*, (1996) [255], empregou 10 µg/mL de Ag heterólogo do metacestodo de *T. crassiceps* para avaliar o imunodiagnóstico de cisticercose em porcos. Já PINTO P.S.A, *et al.*, 2000 [248] apresentaram o diagnóstico de cisticercose em porcos usando uma variação de 2 µg/mL a 5 µg/mL de antígeno de *T. solium* e *T. crassiceps*. Essas concentrações são superiores às utilizadas neste trabalho, que variaram de 0,1 a 2,0 µg/mL de Ag de *T. solium*. Nesse sentido e considerando um limite de detecção superior a 0,1 µg/mL, demonstra-se uma maior sensibilidade do nanobiossensor por LSPR proposto.

Para concentrações de antígeno entre 0,5 µg/mL e 1,5 µg/mL observa-se uma faixa de detecção linear (linha vermelha na Figura 69), apresentando um coeficiente de correlação de 0,983, e uma sensibilidade de 16 nm/(µg/mL) sugerindo que o Ag de *T. solium* pode ser detectado quantitativamente neste alcance. Analogamente, também foi observada uma faixa linear para detecção de agentes biológicos e biomarcadores utilizando SPR, para *E. coli* [246], para *Trypanosoma cruzi* [248], para dipeptidil peptidase [244] e para 17ß-estradiol [245].

5.2.6 TESTE COM SORO HUMANO

Amostras de soro humano positivas e negativas foram utilizadas para detecção de *T. solium*. A amostra de soro positiva foi coletada de um paciente com neurocisticercose sintomática, confirmada pela técnica de ELISA, e a amostra de soro negativa foi coletada de um voluntário saudável. Ambas as amostras de soro foram fornecidas pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes-UFRJ. Uma vez que o soro apresenta propriedades diferentes, como turbidez e a presença de outras proteínas, que afetam o índice de refração, diferentes desvios de pico LSPR podem ser esperados [249, 256], como vistos na Figura 70.

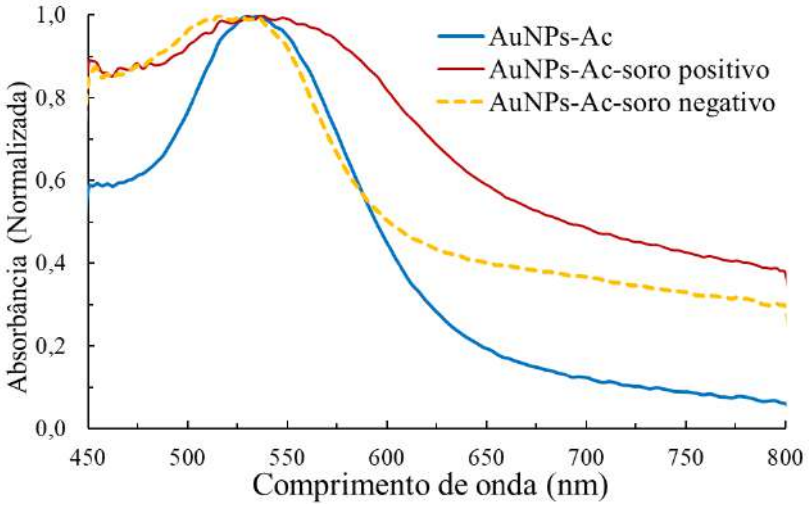


Figura 70 - Espectros de absorbância de UV-Vis de conjugados de anticorpos AuNPs-Ac após adição de amostras de soro humano.

A Figura 70 mostra a resposta do nanobiossensor para ambas as amostras de soro, sendo que para o soro positivo produziu um desvio de LSPR em torno de 16,2 nm devido à interação entre antígenos conjugados em AuNPs e o anticorpos apresentados na amostra. Por outro lado, a amostra de soro negativa apresentou um pequeno desvio de LSPR, que ocorreu devido à ligeira alteração do IR circundante e à alta sensibilidade do nanobiossensor inerente à técnica de LSPR [75, 250]. Nesse sentido, os efeitos das

espécies estranhas e ligantes inespecíficos são baixos na amostra de soro negativa, o que sugere boa especificidade e potencial do nanobiossensor para detecção de *T. solium* em amostras clínicas para diagnóstico de pacientes com neurocisticercose.

As amostras clínicas foram cedidas pelo laboratório de Microbiologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes-UFRJ, como resultado de um projeto de pesquisa desenvolvidos por eles [220].

5.3 SENSOR POR LSPR – SENSOR 2

Foram produzidos sensores a fibra óptica plástica em "U" com as extremidades devidamente polidas e clivadas antes de serem funcionalizadas com as AuNPs sintetizadas pelo MCMS. Para melhor visualização, o protocolo foi realizado também sobre a superfície de placas de PMMA como vistos na Figura 71.



(a) (a)

Figura 71- (a) Placas de PMMA sendo funcionalizadas com suspensões de AuNPs; (b) Placas de PMMA funcionalizadas com AuNPs

Após esta etapa, os nanossensores em "U" contendo AuNPs foram imersos em diferentes concentrações de solução de sacarose para a levantamento da sensibilidade máxima do sensor em função do IR meio. Os resultados são apresentados na Figura 72.

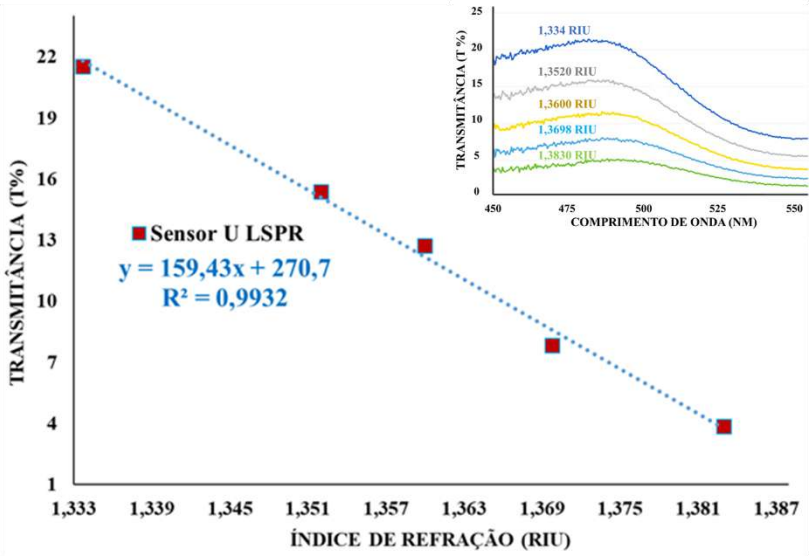


Figura 72- Medidas da transmitância versus índices de refração do meio circundante do sensor em "U" funcionalizado com AuNPs.

Na Figura 72, os nanossensores em “U” funcionalizados com AuNPs apresentaram redução da intensidade da luz transmitida em função do aumento do IR do meio e uma sensibilidade máxima de 159,43 nm/RIU. O pico máximo de comprimento de onda das AuNPs ficou entre 475 e 550 nm, o que é característico da presença das AuNPs sobre a superfície da POF. Contudo, houve uma maior predominância do efeito do campo evanescente da fibra óptica encurvada em relação ao efeito do LSPR, resultado da polidispersidade das AuNPs sobre a superfície, mesmo quando funcionalizada em grandes concentrações.

Em virtude da baixa intensidade do sinal transmitido em função do IR do meio, e pela maior predominância da perda de luz por refração, optou-se por sugerir o desenvolvimento deste nanobiossensor como trabalhos futuros, assim como a realização e possíveis ajustes do protocolo de imobilização sobre a superfície das AuNPs na POF. Isso porque a construção de nanobiossensores com este tipo de configuração permitiria o desenvolvimento e uso de sistemas optoeletrônicos mais econômicos, o efeito do LSPR, e consequentemente com maior sensibilidade na detecção de analitos

6. CONCLUSÃO

A proposta deste trabalho foi desenvolver uma solução rápida e portátil para a detecção da bactéria *E. coli* e da *T. solium* aplicando a nanotecnologia.

O efeito do nanofilme de ouro sobre os sensores foi estudado através de testes com soluções de sacarose. O nanofilme com espessura de aproximadamente 70 nm apresentou um comportamento linear em uma faixa mais estreita, de 1,33 a 1,38, e uma resposta diretamente proporcional ao índice de refração, equivalente às respostas de sensores semelhantes que funcionam por SPR. Embora o filme de ouro reduza a sensibilidade em relação ao sensor sem ouro, o nanofilme apresenta como vantagem uma melhor imobilização dos anticorpos à superfície da POF e o efeito do SPR.

O nanobiossensor por SPR foi capaz de detectar a presença da bactéria *E. coli* em à uma concentração de 1,5 x 10^3 UFC/mL. Nos testes de seletividade, o sensor não capturou a bactéria *Bacillus subtilis* (gram-positivas), mesmo na concentração de 1,5 x 10^8 UFC/mL, considerada elevada. Contudo, o sensor detectou a presença da *Salmonella*. Isso é atribuído ao uso de anticorpos policlonais de *E. coli* que pode reagir de forma cruzada com *enterobacteriaceae* relacionadas, incluindo a *Salmonella*. Portanto, recomenda-se para testes seletivos da bactéria o uso de anticorpos monoclonais.

Nanobiossensores baseados em LSPR para detecção de antígenos de *T. solium* usando suspensão coloidal de AuNPs e por imobilização em POF em "U" foram desenvolvidos. Foram produzidas duas suspensões coloidais de AuNPs, sendo a primeira pelo método de *Turkevich* que se mostrou inviável para a funcionalização dos anticorpos *anti-T.solium* e o outro pelo Método de Crescimento Mediado por Semente adaptado para a síntese de nanoesferas de ouro.

As AuNPs sintetizadas pelo Método de Crescimento Mediado por Semente presentaram uma melhor estabilidade química e bioquímica durante a funcionalização com anticorpo de *T. solium*, em comparação às AuNPs sintetizadas pelo método de *Turkevich*.

Concentrações de 0,1 µg/mL a 2,0 µg/mL de antígeno de *T. solium* foram detectadas em suspensões coloidais de AuNPs, mostrando detecção rápida em apenas 5 minutos, uma sensibilidade de 16 nm/(µg/mL) e Limite de detecção (LOD) superior a 0,1 µg/mL. O nanobiossensor por suspensão coloidal de AuNPs foi capaz de distinguir uma amostra de soro humano positiva de uma negativa, correspondendo a indivíduos portadores e não

portadores da NCC respectivamente. Desse modo, o nanobiossensor desenvolvido poderá se tornar uma nova ferramenta para o diagnóstico da neurocisticercose.

O nanobiossensor a POF em "U" contendo AuNPs não apresentou biocompatibidade para ser funcionalizados com anticorpos de *T. solium* e, portanto, sugere-se um estudo mais detalhado para otimização deste protocolo, ao qual não foi possível devido as inúmeras restrições experimentais em virtude do isolamento social imposta pela pandemia da COVID-19.

Portanto, em suma, concluímos que o nanobiossensor a POF em "U" contendo nanofilme de ouro foi capaz de detectar concentrações de *E. coli* em suspensão com limite de detecção menores que os sensores reportados na literatura, podendo ser otimizado e empregado na análise periódica da balneabilidade das águas de rios e mares. O nanobiossensor coloidal foi capaz detectar antígenos de *T. solium* e pode ser usado para o diagnóstico de pacientes portadores da neurocisticercose. Já o nanobiossensor a POF imobilizado com as AuNPs será necessário um maior aprofundamento.

6.1 TRABALHOS FUTUROS

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

- Desenvolver um *setup* portátil, mais sensível, com saída em POF, uso de LEDs pelo efeito do SPR;
- Testar anticorpos monoclonais nos protocolos de imobilização da *E. coli*;
- Com objetivo de aumentar a distribuição e concentração das nanopartículas imobilizadas sobre a POF em "U", novos protocolos podem ser testados.

7.REFERÊNCIAS

[1] FERREIRA, H.S., RANGEL, M.C., 2009, "Nanotechnology: general aspects and potential applications in catalysis," *Química Nova*, v.32, n.7, pp.1860-1870.

[2] PHILIP, D., 2010, "Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosa sinensis," *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, v.42, pp.1417-1424.

[3] HURST, M.N., DELONG, R.K., 2016, "Spectral signature analysis of surface functionalized nanoparticles", Molecular Devices. Disponível em:<https://www.moleculardevibces.com/sites/default/files/en/assets/app-note/br/spectral-signature-analysis-of-surfacefuncionalizedna noparticles.pdf>. Acesso em: 10 set. 2021.

[4] NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE (NNI). Disponível em: <https://www.nano.gov/about-nanotechnology/what-is-so-special-about-nano>. Acesso em: 01 set. 2021.

[5] SANTOS, J.F.L., SANTOS, M.J.L., THESING, A., TAVARES, F., GRIEP, J.,RODRIGUES, R.F., 2016, "Ressonância de Plásmon de Superfície Localizado e Aplicação em Biossensores e Células Solares," *Química Nova*, v.39, n.9, pp.1098-1111.

[6] PARREIRA, D.B., LEITÃO, T.G., 2010, "Cluster do conhecimento nanotecnologia," Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). Disponível em:<https://inpi.justica.gov.pt/Portals/6/PDF%20INPI/Nano%20inova%C3%A7%C3%Bes/Nanobiossensores.pdf?ver=201708-28-152147-283. Acesso em: 02 jun. de 2021.

[7] LIZ-MARZÁN, L.M., 2006, "Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles," *Langmuir*, v.22, n.1, pp.32–41.

[8] SCARANO, S., PASCALE, E., PALLADINO, P., FRATINI, E., MINUNNI, M., 2018, "Determination of Fermentable Sugars in Beer Wort by Gold Nanoparticles@polydopamine: A Layer-by-Layer Approach for Localized Surface Plasmon Resonance Measurements at Fixed Wavelength," *Talanta*, v.183 (Fev), pp. 24-32.

[9] DANIEL, M.C.M., ASTRUC, D., 2004, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology," *Chemical Reviews*, v.104, n.1, pp. 293–346.

[10] 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. 2739–2779.

[11] DEBNATH N., DAS, S., 2020, "Nanobiosensor: Current Trends and Applications," NanoBioMedicine, *Springer*, Singapore. pp.389-409.

[12] SEPÚLVEDA, B., ANGELOMÉ, P.C., LECHUGA, L.M., LIZ-MARZÁN, L.M., 2009, "LSPR-based anobiosensors," *Nano Today*, v.4, n.3, pp. 244–251.

[13] DIVAGAR, M., SAI, V.V.R., M., 2018, "Fiber Optic Plasmonic Sandwich Immunosensor: Influence of AuNP Label Size and Concentration," 2018 IEEE SENSORS, pp.1-4.

[14] MIRANDA, P.H.Q., COSTA, M.E., CHAKER, J.A., BRASIL, L.M., 2018, "Biosensores para diagnóstico de doenças causadas por vírus: uma revisão," Hegemonia-Revista Eletrônica do Programa de Mestrado em Direitos Humanos, Cidadania e Violência/Ciência Política do Centro Universitário Unieuro, n.27, pp.105-127.

[15] MS, Ministério da Saúde, 2010, "Doenças infecciosas e parasitárias," Guia de bolso, 8° ed, pp. 444, Brasília-DF, Disponível em:<https://www.cremerj.org.br/publicacoesonline/145/>. Acesso em: 08 jun. 2021.

[16] LASBIK, A.F., PINTO, P.S.A., BEVILACQUA, P.D., NERO, L.A., SANTOS, T.O., FELIPPE, A.G., 2010, "Prevalência do complexo teníase-cisticercose na zona rural do município de Viçosa, Minas Gerais," Parasitologia, *Ciência Rural*, v.40, n.7, pp. 1664-1667.

[17] LEMOS, M., 2020, “Teníase (infecção por Tênia): o que é, sintomas e tratamento,” Revista on-line tua saúde. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/teniase/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

[18] COYLE, C.M., MAHANTY, S., ZUNT, J.R., WALLIN, M.T., CANTEY, P.T., WHITE, A.C., O’NEAL, et al., 2012, “Neurocysticercosis: Neglected but not forgotten,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.6, n.5, pp.e1500.

[19] WHO/UNICEF, World Health Organization /United Nations International Children's, 2015, “Emergency Fund-Progress on sanitation and drinking water: 2015 update and MDG assessment,” pp.90. Disponível em:<https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/1-em-cada-3-pessoas-no-mundo-nao-tem-acesso-agua-potavel-dizem-unicefms#:~:text=Crca%2de%202%2C2%20bilh%C3%B5es,para%20a%20higieniza%C%A7%C3%A3o%20das%20m%C3%A3os>. Acesso em: 02 mai. 2021.

[20] RICET, Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales, 2015, “Endemicity of *Taenia Solium*, 2015.” Disponível em: <https://www.ricet.es/noticias/cisticercosis>. Acesso em: 21 jun. 2020.

[21] DIAZ, J. F., VERASTEGUI, M., GILMAN, R.H., TSANG, V.C., PILCHER, J.B., GALLO, C., et al., 1992, “Immunodiagnosis of human cysticercosis (Taenia solium): a field comparison of an enzyme-linked-immu- nosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and enzyme-linked-immuno-electrotransfer blot (EITB) assay in Peru The Cysticercosis Working Group In Peru”. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. v.46, pp.610– 615.

[22] DEL, B.O., RAJSHEKHAR V., WHITE A.C, Jr., TSANG V.C, NASH T.E *et al*., 2001 “Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis,” *Neurology*, v.57, pp.177–183.

[23] NUNES, D.S., 2017, Frações Antigênicas de Metacestódeos de Taenia saginata na Neurocisticercose humana: Análise proteomica e aplicações em plataformas imunodiagnósticos. *Tese de D.Sc.*, UFMG, Uberlândia, MG, Brasil.

[24] RIBEIRO, N.A.S., TELLES, E.O., BALIAN, S.C., 2012, “O Complexo Teníase Humana-Cisticercose: ainda um sério problema de saúde pública,” *Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP*, v.10, n.1, pp.20–25.

[25] HOMERO, V., 2006., “*E. coli* patogênica em rebanhos é risco mundial de saúde pública”, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em:< http://www.faperj.br/?id=830.2.9>. Acesso em: 10 out. 2021.

[26] SANTOS, J. M. R., RIBEIRO, M. C., RIBEIRO, G. C., SOUZA, A. P. F., NASCIMENTO, C. D., LOPES, R. C. R., 2017, “Estudo sobre a ocorrência de surtos alimentares em uma região do Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais,” *Vigilância Sanitária em Debate*, v.5, n.3, julho/ setembro, pp. 30-36

[27] MINISTÉRIO DA SAUDE, 2020 “Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)”. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha. Acesso em: 15 mar. 2022.

[28] MINISTÉRIO DA SAUDE, 2020 “Distribuição temporal dos surtos notificados de doenças transmitidas por alimentos – Brasil, 2007-2018”. https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/informe-sobre-surtos-notificados-de-doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos-2013-brasil-2016-2019.pdf/view. Acesso em: 15 mar. 2022.

[29] SCHUTZ, P.A., 2018, “Há mais história lá embaixo – um convite para rever uma palestra,” *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v.40, n.4, pp.e4210-4215.

[30] FEYNMAN, R.P., 1960, “There’s Plenty of Room at the Bottom, Engineering and Science, v.XXIII, n.5. Disponível em: <https://calteches.library.caltech.edu/47/3/ES.23.5.19600.pdf>. Acesso em 14 de set. 2021.

[31] NANO.gov. “National Nanotechnology Initiative”. Disponível em: <https://www.n ano.go v/.> Acesso em: 23 ago. 2021.

[32] JEEVANANDAM, J., BARHOUM, A., CHAN, Y.S., DUFRESNE, A., DANQUAH, M.K.,2018, “Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations,” *Beilstein Journal Nanotechnology*, v.3, n.9, pp. 1050-1074.

[33] CHANDRA, P., SINGH, J., SINGH, A., SRIVASTAVA, A., *et al*., 2013, “Gold Nanoparticles and Nanocomposites in Clinical Diagnostics Using Electrochemical Methods”, *Journal of Nanoparticles*, v.2013, pp.12.

[34] HUANG, X. e EL-SAYED, M., 2010, “Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in câncer diagnosis and photothermal therapy”, *Journal of Advanced Research*, v.1, n1, pp. 13-28.

[35] KIMLING, J., MAIER, M., OKENVE, B., KOTAIDIS, V., BALLOT, H., PLECH, A., 2006, “Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited,” *Journal of Physical Chemistry B*, v.110, n.32, pp.15700-15707.

[36] KHAN, I., SAEED, K., KHAN, I., 2019, “Nanoparticles: Properties, Applications and toxicities,” *Arabian Journal of Chemistry*, v.12, n.7, pp. 908-931.

[37] SU, Y., WEI, X., PENG, F., ZHONG, Y., LU, Y., et al., 2012, "Gold Nanoparticles-Decorated Silicon Nanowires as Highly Efficient Near-Infrared Hyperthermia Agents for Cancer Cells Destruction," *Nano Letters*, v.12, pp.1845–1850.

[38] DREADEN, E.C., ALKILANY, A.M., HUANG, X., MURPHY, C.J., EL-SAYED, M.A., 2012, “The golden age: gold nanoparticles for biomedicine,” *Chemistry Society Royal*, v.41, pp. 2740- 2779.

[39] TURKEVICH, J., STEVENSON, P.C., HILLIER, J., 1951, “A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold,” *Discussions of the Faraday Society*, v.11, pp.55–75.

[40] LANH, L.T., HOA, T.T., CUONG, N.D., KHIEU, D.Q., QUANG, D.T., DUY, N.V., HOA, D.N., HIEU, N.V., 2015, “Shape and Size Controlled Synthesis of Au Nanorods: H2S Gas-Sensing Characterizations and Antibacterial Application,”*Journal of Alloys and Compounds*, v.635, pp.265–71.

[41] SILVA, M.G.A., NUNES, A.M., MENEGHETTI, S.M.P., MENEGHETTI, M.R., 2013, “News aspects of gols nanorod formation via seed-mediated method,” *Comptues Rendus Chimie*, v. 16, n.7, pp.640-650.

[42] OLDENBURG, SJ., AVERITT, R.D., WESTCOTT, S.L., HALAS, N.J., 1998, “Nanoengineering of optical resonances,” *Chemical Physics Letters*, v.288, n.2-4, pp. 243-247.

[43] ALAQAD, K., SALEH, T.A., 2016, “Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs,” *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, v.6, n.4, pp.1-10.

[44] SILVA, F.A., COSTA, L.V., 2020, “Nanopartículas Plasmônicas – O Fenômeno da Ressonância Plasmônica de Superfície,” Linkedin. Disponível em: https://pt.linkedin.com/pulse/nanopart%C3%ADculas-plasm%C3%B4nicas-o-fen%C3%B4meno-da-resson%C3%A2ncia-de-anchieta. Acesso em: 23 jun. 2021.

[45] CAO, G., WANG, Y., 2011, “Nanostructures and Nanomaterials,” *World Scientific*, v.2, p.17-30.

[46] SANTOS, D.P., GRASSESCHI, D., 2020, “Nanomateriais Plasmônicos: Parte II. Química de coordenação de superfície e sua aplicação em sensores e catalisadores,” *Química Nova*, v.43, n.10, pp.1482-1499.

[47] TWI. Disponível em: <https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/what-are-nanoparticles>. Acesso em: 4 ago. 2021.

[48] FIGUEIRA, S.C., SANTOS, R.P., 2017, "Biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando vegetais," *Nanocell News*, v.4, n.14.

[49] LIU, D., LI, C., ZHOU, F., ZHANG, T., ZHANG, H., et al., 2015, "Rapid Synthesis of Monodisperse Au Nanospheres through a Laser irradiation-Induced shape convesion, self-assembly and their Electromagnetic coupling SERS enhancement," *Scientific Reports*, v.5, n.7686.

[50] ALEX, S., TIWARI, A., 2015, "Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications a review," *Journal Nanoscience and Nanotechnology*, v.15, n.3, pp. 1869–1894.

[51] FIGUEIREDO, N.M., SERRA, R., CAVALEIRO, AL., 2021, "Robust LSPR Sensing Using Thermally Embedded Au Nanoparticles in Glass Substrates," *Nanomaterials*, v.11, n.1592, pp.14.

[52] LOUIS, C., PLUCHERY, O., 2021, "Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology," 2°Edição, pp. 633, *Work Scientific*, London, UK.

[53] MOURDIKOUDIS, S, PALLARES, R.M, THANH, N.T.K., 2018, "Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties," *Nanoscale*, v.10, n.27, pp. 12871-12934.

[54] PEREIRA, M.K., 2009, "Ressonância de Plasmóns de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro", Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física da UFRGS, Porto Alegre.

[55] BORSE, V., KONWAR, A.N., 2020, "Synthesis and characterization of gold nanoparticles as a sensing tool for the lateral flow immunoassay development," *Sensors International*, v.1, 100051, pp.9.

[56] LIU GHOSH, P.; HAN, G.; DE, M.; KIM, C. K.; ROTELLO, V. M., 2008, "Gold nanoparticles in delivery application," *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.60, n.11, pp.1307-1315.

[57] NANOCOMPOSIX. Disponível em: <https://nanocomposix.com/pages/gold-colloid.> Acesso em: 15 ago. 2021.

[58] CAO, J., SUN, T., GRATTAN, K.T.V., 2014 "Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review," *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v.195, pp.332-351.

[59] 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.

[60] CAUCHETEUR, C., GUO, T., ALBERT, J., 2015, "Review of plasmonic fiber optic biochemical sensors: improving the limit of detection," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.407, n.14, pp. 3883-3897.

[61] MITSUSHIO, M., MIYASHITA, K., HIGO, M., 2006, "Sensor properties and surface characterization of the metal-deposited SPR optical fiber sensors with Au, Ag, Cu, and Al," *Sensors and Actuators, A: Physical*, v.125, n.2(Jan), pp.296–303.

[62] RUMAYOR, V. G., 2005, "Aplicaciones de Biosensores En La Industria", Disponível em: <https://www.madrimasd.org/uploads/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/VT1_plicaciones_de_biosensores_en_la_industria_agroalimentaria.pdf>.Acesso em: 29 mar. 2019.

[63] MORDOR INTELLIGENCE. “Nanosensors market - growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)”. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-nanosensors-market-industry>. Acesso em: 14 jul. 2021.

[64] SALEEM, M., 2013, “Biosensors a promising future in measurements,” *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering,* v. 51, p.12012.

[65] MAXIMIZE. “Global Nanosensor Market: Industry Analysis and Forecast (2019-2026) – By Type, Technology, Application, and Region.” Disponível em: <https://www.maximizemarketresearch.com/market-report/global-nanosensor-market/30225/>. Acesso em 14 jul. 2021.

[66] BARROSO, A.F.Á.A., 2014, Nanobiossensores: conceito e aplicações na avaliação de parâmetros bioquímicos e diagnóstico precoce de patologias. Dissertação de MSc., Universidade Do Algarve, UALg, Faro, Portugal, PT. Disponível em: <https://sapientia.ualg.pt/bitstream/1040 0.1/8304/1/DissertaçãoAlexandreBarroso.pdf>. Acesso em: 12 dez.2020.

[67] ALEXANDRE, D. L. *et al*. 2018, “A Rapid and Specific Biosensor for *Salmonella typhimurium* Detection in Milk”. *Food and Bioprocess Technology*, v. 11, n. 4, p. 748-756.

[68] SAI, V.V.R., KUNDU, T., MUKHERJI, S., 2009, “Novel U-bent fiber optic probe for localized surface plasmon resonance based biosensor,” *Biosensors & Bioelectronics*, v.24, pp. 2804–2809.

[69] GRIESHABER, D., MACKENZIE, R., VOROS, J., REIMHULT, E., 2008, “Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures,” *Sensors (Basel, Switzerland),* v.8, n.3, pp. 1400-1458.

[70] MEHRVAR, M., BIS, C., SCHARER, J.M., et al., 2000, “Fiber-Optic Biosensors –Trends and Advances”, *Analytical Sciences*, v.16, pp.677-684.

[71] WANG, J., 2000, “From DNA biosensors to gene chips,” *Nucleic Acids Research*, v.15, n.28, pp. 3011-3016.

[72] OLIVEIRA, A.E.F., PEREIRA, A.C., 2016, “Biossensores e a Indústria Alimentar Revisão,” *Revista Virtual de Química*, v.8, n.6, pp. 1311-1333.

[73] SUTHANTHIRARAJ, P.P.A., SEN, A.K., 2019, "Localized surface plasmon resonance (LSPR) biosensor based on thermally annealed silver nanostructures with on-chip blood-plasma separation for the detection of dengue non-structural protein NS1 antigen," *Biosensors and Bioelectronics*, v.1, n.132, pp.38-46.

[74] SAMAVATI, A., SAMAVATI, Z., VELASHJERDI, M., FAUZI ISMAIL, A., OTHMAN, M.H.D., EISAABADI, G., et al., 2020, "Sustainable and fast saliva-based COVID-19 virus diagnosis kit using a novel GO-decorated Au/FBG sensor," *Chemical Engineering Journal*, v.15, n. 420:127655, pp.1-9.

[75] LUZ, J.G.G., SOUTO, D.E.P., MACHADO-ASSIS, G.F., LANA, M., KUBOTA, L.T., LUZ, R.C.S., DAMOS, F.S., MARTINS, H.R., 2015, “Development and evaluation of a SPR-based immunosensor for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in human serum,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, v.212, pp.287-296.

[76] SONG, L., ZHANG, L., HUANG, Y., CHEN, L. ZHANG, G.; SHEN, Z. et al., 2017, “Amplifying the signal of localized surface plasmon resonance sensing for the sensitive detection of Escherichia coli O157:H7,” Sci. Rep., v.7, n.3288, pp.1-8.

[77] HALKARE, P., PUNJABI, N., WANGCHUK, J., KONDABAGIL, K., MUKHERJI, S., 2015, “LSPR based fiber optic sensor for detection of *E. coli* using bacteriophage T4,” *Workshop on Recent Advances in Photonics (WRAP)*, Bangalore, pp.1-4.

[78] 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. 276–283.

[79] GONG-JUN, Y., JIN-LIN, H., WEN-JING, M., MING, S., XING-AN, J., 2009, "A reusable capacitive immunosensor for detection of *Salmonella* spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle monolayers," *Analytica Chimica Acta*, v.11, n.647, pp. 159-66.

[80] KIM, G.; MOON, J.; MOH, C.; LIM, J., 2015, "A microfluidic nano-biosensor for the detection of pathogenic *Salmonella*" *Biosensors and Bioelectronics*, v.67, n.15, pp.243-247.

[81] KO, S., PARK, T.J., KIM, H.S., KIM, J.H., CHO, Y.J., 2009, "Directed self-assembly of gold binding polypeptide-protein A fusion proteins for development of gold nanoparticle-based SPR immunosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, v.24, n.8, pp.2592-2597.

[82] BACCAR, H., MEJRI, M. B., HAFAIEDH, I., KTARI, T., AOUNI, M., ABDELGHANI, A., 2010, "Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection," *Talanta*, v.82, n.2, pp. 810-14.

[83] MAXIMINO, F.L., 2011, "Caracterização de Plásmons de Superfície em Filmes de metais nobres através de tunelamento ótico," Dissertação apresentado ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

[84] METALLIC BONDING. Disponível em: https://saintschemistry10.weebly.com/metallic-bonding.html. Acesso em: 02 jan.2020.

[85] PARVEEN, R., 2017, "Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como um agente de redução e estabilização ecológica e de baiso custo," Tese de D.Sc., Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-23082017-170833/publico/RashidaParveenrevisada.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2021.

[86]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.

[87] CAVALCANTI, L. M., 2016, Aplicativo Web Para Projeto de Sensores Ópticos Baseados Em Ressonância de Plásmons de Superfície Em Interfaces Planares. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

[88] WILLETS, K.A, VAN DUYNE, R.P, 2007, "Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing," *Annual Review of Physical Chemistry*, v.58, pp.267-297.

[89] ANALYTICAL TECHNOLOGIES, 2020, Disponível em: <https://analytical-online.com/knowledge/comparison-between-lspr-spr>. Acesso em: 23 jun. 2021.

[90] NICOYALIFE. Disponível em: https://nicoyalife.com/nicoya-surface-plasmon-reson ance-resources/what-is-spr/how-does-surface-plasmon-resonance-work/. Acesso em: 15 out. 2021.

[91] NARSAIAH, K., JHA, S.N., BHARDWAJ, R., SHARMA, R., KUMAR, R., 2012, "Optical biosensors for food quality and safety assurance-A review," *Journal of Food Science and Technology*, v.49, n.4, pp.383–406.

[92] CHRISTOPHER, C., SUBRAHMANYAM, A., SAI, V.V.R., 2018, "Gold Sputtered U-Bent Plastic Optical Fiber Probes as SPR and LSPR Based Compact Plasmonic Sensors," *Plasmonics*, v.13, pp. 493-502.

[93] CARVALHO, R.M., SUSANNE, R., KUBOTA, L.T., 2003, "SPR - Uma Nova Ferramenta Para Biossensores," *Quimica Nova*, v.26, n.1(Jun), pp. 97–104.

[94] CAMARA, A. R., 2015, "Biossensor e Dispositivo Eletro-óptico em Fibras Ópticas Especiais". Tese de D. Sc., Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro/PUC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/colecao.php?strSecao=resultado& nrSeq=29585@1>. Acesso em: 3 mai. 2017.

[95] CENNAMO, N., MASSAROTTI, D., GALATUS, R., CONTE, L., ZENI, L., 2013, "Performance comparison of two sensors based on surface plasmon resonance in a plastic optical fiber," *Sensors*, v.13(Jan), pp.721-735.

[96] SZUNERITS, S., SPADAVECCHIA, J., BOUKHERROUB, R., 2014, "Surface plasmon resonance: signal amplification using colloidal gold nanoparticles for enhanced sensitivity," *Reviews in Analytical chemistry*, v.33, n.3. pp. 153-164.

[97] MIE, G., 1908, "A contribution to the optics of turbid media, especially colloidal metallic suspensions," *Annalen der Physik*, v.25, pp. 377-445

[98] HUANG, X, NERETINA, S., EL-SAYED, M.A., 2009, "Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical application," *Advanced Materials*, v.21, pp. 4880-4910.

[99] ANKER, J.N., HALL, W.P., LYANDRES, O., SHAH, N.C., ZHAO, J., VAN DUYNE, R.P., 2008, "Biosensing with plasmonic nanosensors," *Nature Materials*, v.7, n.6, pp.442-453.

[100] BOUSIAKOU, L.G., GEBAVI, H., MIKAC, L., KARAPETIS, S., 2019, "Surface Enhanced Raman Spectroscopy for Molecular Identification-a Review on Surface Plasmon Resonance (SPR) and Localised Surface Plasmon Resonance (LSPR) in Optical Nanobiosensing," *Croatica Chemica Acta*, v.92, n.4, pp.16.

[101] POF CK-20 Disponível em: <https://www.pofeska.com/pofeskae/download/pdf/ f/CK20.pdf.> Acesso em: 14 jul. 2020.

[102] ZUBIA, J., GERMÁN G., ARRUE J., 2000, "Passive Device Based on Plastic Optical Fibers to Determine the Indices of Refraction of Liquids," *Applied Optics*, v. 39 (Mês), n.6, pp. 941-946.

[103] MUTO, S., SUZUKI, O., AMANO, T., MORISAWA, M., 2003, "A plastic optical fibre sensor for real-time humidity monitoring," *Measurement Science and Technology*, v.14, n.6 (Abr), pp. 746-750.

[104] GOUVEIA, C.A.J., 2008, "Sensores em fibra óptica para monitorização ambiental," Dissertação de M.Sc., Universidade da Madeira, Funchal, Portugal.

[105] ZUBIA, J., ARRUE, J., 2001, "Plastic optical fibers: An introduction to their technological processes and applications," *Optical Fiber Technology*, v.7, n.2(Abr), pp.101-140.

[106] KUANG, K.S.C., CANTWELL, W.J., SCULLY, P.J., 2002. "An Evaluation of a Novel Plastic Optical Fibre Sensor for Axial Strain and Bend," *Institute of Physics Publiching* 1523.

[107] 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.

[108] TOWN, Graham E., et al. "Randomly Microstructured Polymer Optical Fibre." ACOFT/AOS 2006 - *Australian Conference on Optical Fibre Technology/Australian Optical* Society, v.204, n.7, 2006, pp. 81-86.

[109] SATO, M., T. ISHIGURE, Y. KOIKE, 2000, "Thermally stable high-bandwidth graded-index polymer optical fiber," *J. Lightwave Tech*., v.1 (Mês), pp. 952-958.

[110] HUSSAINI, U., 2020, “Types of Optical Fibers – Physical Structure of Optical Fibers – Single Mode, Multi-Mode.” Disponível em: <https://www.technobyte.org/types-of-optical-fibers-structure-of-optical-fibers/>. Acesso em: 20 jan. 2020.

[111] CONNECTWORLD. Disponível em: <http://www.connectworld.net/fiber/3m-fiber-certification.html>. Acesso em: 10.dez. 2019.

[112] ZHENG, W., 2014, Polymer Optical Fiber for Smart Textiles. Handbook of Smart Textiles. Disponível em: < https://doi.org/10.1007/978-981-4451-68-0>. Acesso em: 29 dez. 2019.

[113] KAMINO, J., 2000. “A Fibra óptica em Aplicações”. Disponível em: <http://portal.furukawa.com.br/arquivos/i/inf/informativo/2185_fibrasempresariaisOFS.pdf>. Acesso em: 10. jun. 2019.

[114] ARCAS, A. S., 2017, Nanobiossensor a fibra óptica revestido com filme fino de ouro para detecção da bactéria Escherichia coli. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[115] WIKIWAND. Disponível em: <https://www.wikiwand.com/pt/Fibra_%C3%B3ptica>. Acesso em 13. mar. 2019.

[116] TRONCO, T.R., AVILA, L.F., 2007, “Fundamentos de Comunicação Ópticas,” Universidade de Campinas, UNICAMP, São Paulo, 1ºEd. Disponível em: <https://www.ft.unicamp.br/~lfavila/FT067/fundamentos%20de%20comunica%E7%F5es%20opticas.pdf. Acesso em: 10 nov. 2021.

[117] PUNJABI, N., SATIJA, J., MUKHERJI, S., 2014, “Evanescent wave absorption based fiber-optic sensor - Cascading of bend and tapered geometry for enhanced sensitivity,” *Sensing Technology: Current Status and Future Trends I*, v.11, capitulo 2, pp.25-45.

[118] AZKUNE, M., RUIZ-RUBIO, L., ALDABALDETREKU, G., ARROSPIDE, E., *et al.*, 2018, “U-Shaped and Surface Functionalized Polymer Optical Fiber Probe for Glucose Detection,” *Sensors*, v.18, n.1(Dez), pp. 34-44.

[119] GENG, T., UKNALIS, J., TU, S.-I., BHUNIA, A.K., 2006, “Fiber-Optic Biosensor Employing Alexa-Fluor Conjugated Antibody for Detection of *Escherichia coli* O157H7 from Ground Beef for Four Hours,” *Sensors*, v.6, n.8, pp.796–807.

[120] 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.

[121] 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.

[122] CHEN, K. C., LI, Y L. WU, C. W., CHIANG, C. C., 2018, “Glucose Sensor Using U-Shaped Optical Fiber Probe with Gold Nanoparticles and Glucose Oxidase,” *Sensors*, v.18, n.4 (Abr), pp.1217-1227.

[123] ARCAS, A.S., DUTRA, F.S., ALLIL, R.C.S.B., Werneck, M.M., 2018, “Surface plasmon resonance and bending loss-based U-shaped plastic optical fiber biosensors,” *Sensors*, v.18, n.2, pp.1–16.

[124] LOPEZ, J.D., CASTELLANOS, M.A., RIASCOS, H., 2021, “Influence of substrate temperature on graphene 2 oxide thin films synthesis by laser ablation 3 technique,” *Journal of Vacuum Science e Techonology A.*, v.40, n1, pp.1-9.

[125] OXFORD INSTRUMENTS. “Introduction to optical diagnostics for Pulsed Laser Deposition (PLD)”. Disponível em: <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/pulsed-laser-deposition>. Acesso em: 26 nov. 2021.

[126] KAMARULZAMAN, N., BADAR, N., 2012. “Pulsed Laser Deposition of MgO Thin Films,” *Advanced Materials Research*, v.545, n.2012, pp.38-42.

[127] WIKIMEDIA, 2020, “Thermal evaporation,” Wikimedia Commons, the free media repositor. Disponível em:< https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Thermal_evaporation.jpg&oldid=473823025. Acesso em: 21 nov. 2021.

[128] SHI, F., 2018, “Introductory Chapter: Basic Theory of Magnetron Sputtering,” *IntechOpen*. Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/63559>. Acesso em: 01 nov. 2021.

[129] TUDOSE, I.V., COMANESCU, F., PASCARIU, P., BUCUR, S., RUSEN, L., et al., 2019, “Chemical and physical methods for multifunctional nanostructured interface fabrication,” Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications, 1° Edição, *editora Preview*.

[130] VISUAL SCIENCE, 2008, “Magnetron sputtering technology”. Disponível:<https://www.visual-science.com/projects/magnetron-sputtering/technical-illustration/>. Acesso em: 01 nov. 2021.

[131] SANTOS, J.C.C., 2012, “Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores,” Msc. Programa de Pós-Graduação em Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo.

[132] KARPOVICH, D.S., BLANCHARD, G.J., 1994, “Direct Measurement of the Adsorption Kinetics of Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers on a Microcrystalline Gold Surface,” *Langmuir*, v.10, pp. 3315-3322.

[133] SANTOS, A., RIBEIRO, W.C., BUENO, P.R., 2014, “Estudo in situ da Funcionalização de superfície de ouro para a imobilização de proteína,” *Eclética química*, v.39, pp. 244-256.

[134] CELIKKOL-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.

[136] 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.ci.

[137] NIU, Y., MATOS, A.I., ABRANTES, L.M., VIANA, AS, JIN, G., 2012, “Antibody oriented immobilization on gold using the reaction between carbon disulfide and amine groups and its application in immunosensing,” *Langmuir*, v.21, n.28, pp.17718-25.

[138] WANG, J., DU, S., ONODERA, T., RUI, Y., TANAKA, M., OKOCHI, M., TOKO, K., 2018, "An SPR Sensor Chip Based on Peptide-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes with Enhanced Sensitivity and Selectivity in the Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene Explosives," *Sensors*, v.18, n.12:4461, pp: 1-8.

[139] PELLAS, V., HU, D., MAZOUZI, Y., MIMOUN, Y.,et al., 2020, “Gold Nanorods for LSPR Biosensing: Synthesis, Coating by Silica, and Bioanalytical Applications,” *Biosensors*, v.10, n.146, pp.52.

[140] COSTA, J.S., 2016, “Analise de um Sensor Baseado em Ressonância de Superfície de Plasma Acoplado a um Arranjo Periódico de Nanopartículas Metálicas,” Msc. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Pará, UFPA, Belém.

[141] FERREIRA, D.M., 2016, “Biossíntese otimizada de nanopartículas de ouro com extrato de Virola oleífera,” Msc. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em:< https://repositorio.ufes.br/handle/10/7087>. Acesso em: 17 ago. de 2021.

[142] NANOHYBRIDS, “Ask an Expert: I am trying to choose the right gold nanoparticle for my project. What is the difference between Citrate, CTAB, PEG, Silica and Silica-PEG coatings?” Disponível: <https://nanohybrids.net/pages/what-is-the-difference-between-citrate-cta b-peg-silica-coatings>. Acesso em: 20 jul. 2021.

[143] MANSON, J., KUMAR, D., MEENAN, B.J., DIXON, D., 2011, “Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media,” *Gold Bulletin*, v.44, pp. 99-105.

[144] SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-andimaging/silicacoa ted-gold-nanoparticles>. Acesso em: 21. Out. 2021.

[145] POLTE, J., 2015, “Fundamental growth principles of coloidal metal nanoparticles – a new perspective,” *Royal Society of Chemistry*, v.17, pp. 6809-6830.

[146] GREENWOOD, M., 2018, “Gold Nanoparticles Synthesis,” News Medical Life Sciences. Disponível em: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Gold-Nanoparticle-Synthesis.aspx. Acesso em: 21 set. 2021.

[147] WUITHSCHICK, M., BIRNBAUM, A., WITTE, S., SZTUCKI, M., *et al*., 2015, “Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis,” *American Chemical Society*, v.9, n.7, pp. 7052-7071.

[148] BALASUBRAMANIAN, S. K.; YANG, L. Lin-Yue; ONG, Choon-Nam.; ONG, Wei-Yi.; YU, L. E., 2010, “Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles,” *Biomaterials*, v. 31, p. 9023-9030, 2010

[149] CHEN, P.C., MWAKWARI, S.C. e Oyelere, A.K., 2008, “Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing,” *Nanotechnology Science and Applications*, v.1, pp.45-65.

[150] SHAH, M., BADWAIK, V.D., KHERDE, Y., WAGHWANI, H.K., 2014, “Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications,” *Frontiers in Bioscience*, v.19, pp.1320-1344.

[151] CHEN, Y., ZHAO, Y., YOON, S.J., GAMBHIR, S.S., EMELIANOV, S., 2019, “Miniature gold nanorods for photoacoustic molecular imaging in the second near-infrared optical window,” *Nature Nanotechnology*, v.14, pp. 465-472.

[152] JANA, N.R., GEARHEART, L., MURPHY, C.J, 2001a, “Seed-Mediated Growth Approach for ShapeControlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template,” *Advanced Materials*, v.13, pp. 1389–93.

[153] BRUST, M., WALKER, M., BETHELL, D., SCHIFFRIN, D. J., WHYMAN, R., 1994, “Synthesis of thiolderivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system,” Journal of the Chemical Society, *Chemical Communications*, n.7, pp. 801-802.

[154] SHON, Y-S., CHUC, S., VOUNDI, P., 2009, “Stability of tetraoctylammonium bromideprotected gold nanoparticles: effects of anion treatments,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 352, pp. 12-17.

[155] PHILIP, D., 2009, “Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.73, n.4, pp. 650-653

[156] DAUTHAL, P., MUKHOPADHYAY, M., 2012, “Prunus domestica fruit extract- mediated synthesis of gold nanoparticles and its catalytic activity for 4-nitrophenol reduction,” *Industrial Engineering Chemistry Research*, v.51, n.40, pp.13014-13020.

[157] NARAYANAN, K.B., SAKTHIVEL, N., 2008, “Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles,” *Materials Letters*, v.62, pp. 4588-4590.

[158] BOCA, S.C., POTARA, M., TODERAS, F., STEPHAN, O., BALDECK, P.L.,ASTILEAN, S., 2011, "Uptake and biological effects of chitosan-capped gold nanoparticles on Chinese Hamster Ovary cells," *Materials Science and Engineering: C*, v.31, n.2, pp. 184-189.

[159] AZAM, A., AHMED, F., ARSHI, N., CHAMAN, M., NAQVI, A. H., 2009, "One step synthesis and characterization of gold nanoparticles and their antibacterial activities against E.coli (ATC 25922 strain)," *International Journal of Theoretical e Applied Science*, v.1, n.2, pp. 1-4.

[160] MOHANPURIA, P., RANA, N.K., YADAV, S.K., 2008, "Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications," *Journal of Nanoparticle Research*, v.10, pp. 507-517.

[161] WANG, Z., LEVY, R. FERNING, D.G, BRUST, M., 2005, "The Peptide Route to Multifunctional Gold Nanoparticles," *Bioconjugate Chemistry*, v.16, n.3, pp. 497-500.

[162] RUAN, C., WANG, W., GU, B., 2006, "Surface-enhanced Raman scattering for perchlorate detection using cystamine-modified gold nanoparticles," *Analytica Chimica Acta*, v. 567, pp. 114-120.

[163] HEO, D.N., YANG, D.H., MOON, H.J., LEE J.B., BAE, M.S, et al., 2012, "Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy," *Biomaterial*s, v.33, n.3, pp. 856-66.

[164] DHARMATTI, R., PHADKE, C., MEWADA, A., PANDEY, S., OZA, G., SHARON, C., SHARON, M., 2014, "Surface Orchestration of Gold Nanoparticles Using Cysteamine as Linker and Folate as Navigating Molecule for Synaphic Delivery of Doxorubicin," *Journal of Nanomedicine Research*., v.1, n.1., pp.7.

[165] BARTCZAK, D., KARANAS, A.G., 2011, "Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling," *Langmuir*, v.27, pp. 10119-10123.

[166] CARR, O., 2019, "Desenvolvimento de genossensor para a detecção precoce de câncer de cabeça e pescoço," D.Sc. Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo.

[167] 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". D.Sc., Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

[168] 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).

[169] ECK, W., CRAIG, G., SIGDEL, A., RITTER, G., OLD, L., *et al*., 2008, "PEGylated Gold Nanoparticles Conjugated to Monoclonal F19 Antibodies as Targeted Labeling Agents for Human Pancreatic Carcinoma Tissue," *ACS nano*, v.25, n.11, pp. 2263-2272.

[170] BASSO, C.R., TOZATO, C.C., CRULHAS, B.P., CASTRO, G.R., JUNIO, J.P.A., PEDROSA, V.A., 2018, "An easy way to detect dengue virus using nanoparticle-antibody conjugates", *Virology*, v.513, pp. 85-90.

[171] COSTA, J.S., 2016, "Analise de um Sensor Baseado em Ressonância de Superfície de Plasma Acoplado a um Arranjo Periódico de Nanopartículas Metálicas," MSc. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Pará, UFPA, Belém.

[172] DELONG, R.K., REYNOLDS, C.M., MALCOLM, Y., et al., 2010, "Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules," *Nanotechology Science and Apllications*, v.3, pp 53-63.

[173] PINTO, E.P., RAMOS, G.Q., FILHO, H.D., 2013, "O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica," *Estação Científica (UNIFAP)*, v.3, n.2, p. 41-50.

[174] Zeta Potential of Colloids in Water and Waste Water. ASTM Standard D, 1985, *American Society for Testing and Materials*, p. 4187-82.

[175] VALVERDE, J., 2017, "Methods used to determine the zeta potential of colloids in wastewater," *Journal of Sciences and Engineering*, v.1, n.1, pp.19-32.

[176] HAVELAAR, A.H., BRUL, S., JONG, A., JONGE, R., ZWIETERING, M.H., KUILE, B.H., 2010, "Future challenges to microbial food safety," *International Journal of Food Microbiology*, v.30, v.139, pp.S79 – S94.

[177] JÚNIOR, A.I, BELOTTO, A.J, DHALIA, 2010, "CBC Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos," *Ministério da Saúde:* Brasília, Brasil.

[178] SANAR. Disponível em: <https://www.sanarmed.com/resumo-sobre-escherichia-coli-completo-sanarflix> Acesso em: 10 out. 2021.

[179] WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008, "Guidelines for Drinking-Water Quality" World Health Organization, v.1, Geneva, Switzerland.

[180] LOCKING, M.E., O'BRIEN, S.J., REILLY, W.J., WRIGHT, E.M., CAMPBELL, D.M., et al., 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.215-220.

[181] FORSYTHE, S.J., 2013 "Microbiologia da segurança dos alimentos," 2ed. Porto Alegre: *Artmed*.

[182] FOOD SAFETY BRAZIL, 2017, "Surtos Alimentares no Brasil - Dados atualizados em dezembro de 2016." Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-dezembro-de-2016/>. Acesso em 10 out. 2021.

[183] PORTARIA GM/MS Nº888 DE MAIO DE 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021-318461562>. Acesso em 26 jun. 2021.

[183] RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA (RDC) nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>. Acesso em 26 jun. 2021.

[184] INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>. Acesso em: 26 jun. 2021.

[185] OIE, World Organisation for Animal Health, 2008, "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals," *Office International Des Epizooties*, v.1, 6º ed., pp.110-117.

[186] RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Disponível em: http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf. Acesso em 21 fev. 2022.

[187] (ECL) Laboratório de Referência para Escherichia coli, "Pathogenic E. coli", Université de Montréal. Disponível em: <http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/>. Acesso em 03 out. 2021.

[188] SILVA, C.C.S., BUENO, C.P., 2018, "Pontos de contaminação de carcaças bovinas dentro do fluxograma de abate," *Nutritime Revista Eletrônica*, v.15, n.2, pp. 8147-8152.

[189] SOUZA, N.C.C., 2010, “Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de Escherichia coli em água,” MSc. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

[190] ARCOS, A.N., SILVA, J.S., CUNHA, H.B., 2020, “Grupo coliforme fecal como indicador de balneabilidade em praia de água doce no rio Negro, Amazonas,” *Sociedade de Pesquisa e Desenvolvimento*, v.9, n. 7, pp. 1-17, e238974015.

[191] 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.

[192] 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.

[193] PAULA, C.M.D., CASARIN, L.S., TONDO, E.C., 2014, “*Escherichia coli O157:H7* - emerging food pathogen,” Revista Visa em Debate, Sociedade, Ciência e Tecnologia, v.2, n.4, pp. 23-33.

[194] SANAR. ELISA: Teste Sorológico. Disponível em: <https://www.sanarmed.com/elisa. Acesso em: 15 mai. 2021.

[195] BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Disponível em: https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay. Acesso em: 02 jul.2021.

[196] PENSABIO. Disponível em: <https://www.pensabio.com.br/post/2019/03/21/con heca-os-diferentes-tipos-de-elisa>. Acesso em: 01 jun.2021.

[197] THERMOFISHER. Overview of ELISA. Disponível em:<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learningcenter/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>.Acesso em: 02 jul.2021.

[198] POSSAS, J.L.S., 2014, “Aplicação do Conceito do Erro Total, dos Perfis de Exatidão e dos Índices de Exatidão na Validação em um de um Imunoensaio para Detecção de Ovoalbumina em Vacina Contra Febre Amarela,” MSc., Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

[199] ROLDÁN, W.H., e ESPINOZA, Y.A., 2009, “Evaluation of an enzyme-linked immuno-electrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis,” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n.3, pp.411-418.

[200] KURIEN, B., SCOFIELD, R.H., 2006, “Western Blotting,” *Methods*, v.38, n4, pp.283-293.

[201] LAZCKA, O., CAMPO, J., MUNOZ, F., 2006, “Pathogen detection a perspective of traditional methods and biosensors, “*Biosens. Bioelectron*, v.22, pp. 1205-1217.

[202] PAWLOWSKI, Z.S, MURRELL K.D., 2001, “Taeniasis and cysticercosis,” *Foodborne disease handbook*, 1ªed. v.2, New York, pp. 217-227.

[203] PRADO-JEAN, A., KANOBANA, K., DRUNET-CABANAC, M., et al., 2007, “Combined use of an antigen and antibody detection enzyme-linked immunosorbent assay for cysticercosis as tools in an epidemiological study of epilepsy in Burundi,” *Tropical Medicine and International Health*, v.12, n.7, pp.895-901.

[204] NEVES, D.P., MELO, A. L., LINARDI, P. M., VITOR, R. W. A., 2016, “Parasitologia Humana,” *Atheneu*, 13º ed., São Paulo, pp. 227-237.

[205] VIEIRA, S., GUIMARÃES, F., 2016, "Neurocisticercose humana e sua relação com epilepsia na América: estudo de revisão,” *Laureate International Universities* -IBMR.

[206] SAVIOLI, L.S, DAUMERIE, D., 2010, “First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases,” *Geneva: World Health Organisation,* pp.1-169. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44440>. Acesso em: 23 jun. 2020.

[207] PEARSON, R.D., 2018, “Infecção por *Taenia solium* (tênia da carne de porco) e cisticercose,” Manual MSD Versão para Profissionais de Saúde. Disponível em: <https: //www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/cest% C3%B3eos-vermes-emfita/infec%C3%A7%C3%A3o-por-taenia-solium-t%C3%AAnia-da-carne-de-porco-e-cisticercose>. Acesso em: 8 jun. 2021.

[208] BRUNO, E., BARTOLONI, A., ZAMMARCHI, L., STROHMEYER, M., *et al*., 2013, “Epilepsy and Neurocysticercosis in Latin America: A Systematic Review and Meta-analysis,” *PLoS Neglected Tropical Diseases,* v.7, n.10, pp.1-11.

[209] DIVE, Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Teniase_X_Cisticercose.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2021.

[210] BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, J. A. L.; LIVRAMENTO, J. A.; MIELLE, S. R., 2000, “Specific Taenia crassiceps and *Taenia solium* Antigenic Peptides for Neurocysticercosis Immunodiagnosis using Serum Samples,” *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.1, pp.146-151.

[211] DEL BRUTTO, O.H., NASH, T.E., WHITE, A.C.Jr., RAJSHEKHAR, V., WILKINS, P.P., et al., 2017, “Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis,”*Journal of the Neurological Sciences*, v.372, p.202-210.

[212] WHITE, A.C., COYLE, C.M., RAJSHEKHAR, V., SINGH, G., et al., 2018, “Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis: 2017 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH),” *Clinical Infectious Diseases*, v.66, n.8, pp. e49–e75.

[213] GARG, R.K., DESAI, P., KAR, M., KAR, A.M., 2008, “Multiple ring enhancing brain lesions on computed tomography: an Indian perspective,” *Journal of the Neurological Sciences*, v.266, p.92-96.

[214] ROSAS, N., SOTELO, J., NIETO D., 1986, “ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis,” *Arch Neurol*, v.43, pp.353–356.

[215] REIS, M., 2020, “Punção lombar: o que é, para que serve, como é feita e riscos,” Tua Saúde. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/puncao-lombar/>. Acesso em: 24 jun. 2021.

[216] DECKERS, N., DORNY, P., 2010, “Immunodiagnosis of *Taenia solium taeniosis*/cysticercosis,” *Trends in Parasitology*, v.26, p.137-144.

[217] LIN, X., LUO, H., ZHOU, Y., WAN, N., WU, J., 2018, “A Rapid Serologic Diagnosis Sensor for Taenia Solium Cysticercosis,” *17th International Meeting on Chemical Sensors - IMCS*, pp.667–667. Disponível em: <https://doi.org/10.5162/imcs2018/p1dh.6>. Acesso em: 10 set. 2019.

[218] GILMAN, R.H., GONZALEZ, A.E., LLANOS-ZAVALAGA, F., TSANG, V.C.W., GARCIA, H.H., 2012, “Prevention and control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Peru,” *Pathogens and Global Health*, v.106, pp. 312-318.

[219] MAHANTY, S., GARCIA, H.H., 2010, “Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system,” *Progress in Neurobiology*, v.91, pp.172-184.

[220] PARDINI, A.X, PERALTA, R.H., VAZ, A.J., MACHADO, L.R., PERALTA, J.M., 2002, “Use of *Taenia Crassiceps Cysticercus* Antigen Preparations for Detection of Antibodies in Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Neurocysticercosis (*Taenia Solium*),” *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, n.1, pp.190-93.

[221] MARTINSSON, E., SEPULVEDA, B., CHEN, P., ELFWING, A., LIEDBERG, B., AILI, D., 2013, "Optimizing the Refractive Index Sensitivity of Plasmonically Coupled Gold Nanoparticles," *Plasmonics*, v.9, n.4, pp.773-780.

[222] MCFARLAND, 2010. "Padrão de Turvação preparado BBL." Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=20546>. Acesso em: 6 nov. 2015.

[223] ZIBAII, 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.

[224] WANG, C., IRUDAYARAJ, J., 2008, "Gold nanorod probes for the detection of multiple pathogens," *Small*, v.4, n.12, pp. 2204-2208.

[225] DIAS, R.P., 2020, "Comparação entre duas técnicas de produção de sensores refratométricos a fibra óptica com nanoestruturas de ouro," D.Sc. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industria da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UFTPR).

[226] GASPAR, C. H., 2010, Preparação e Caracterização de Nanocompósitos de Nanopartículas Metálicas e Proteínas e Suas Aplicações Em Biossensores. M.Sc., Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

[227] CHEN, I,C., LIN, S.S, LIN, T.J., DU, J.K., 2011, "Detection of Hydrofluoric Acid by a SiO2 Sol-Gel Coating Fiber-Optic Probe Based on Reflection-Based Localized Surface Plasmon Resonance," *Sensor (Basel)*, v.11, n 2, pp. 1907-1923.

[228] CHEN, J., SHI, S., SU, R., QI, W., HUANG, R., et al., 2015, "Optimization and Application of Reflective LSPR Optical Fiber Biosensors Based on Silver Nanoparticles," *Sensors*, v.15, pp. 12205-12217.

[229] FLAVEL, B.S, NUSSIO, M.R, QUINTON, J.S, SHAPTER, J.G, 2009, "Adesão de nanopartículas de ouro quimicamente e eletrostaticamente ligadas a uma monocamada de silano automontada investigada por espectroscopia de volume de força atômica," *Journal Nanopart. Res*, v. 11, pp.2013–2022.

[230] SLEPICKA, P., KASÁLKOVÁ, N. S., SIEGEL, J., KOLSKÁ, Z., SVORCIK, V., 2020, "Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation," *Materials*, v.13, n.1.pp.

[231] AMINA, S. J., GUO, B., 2020, "A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle," *International Journal of Nanomedicine*, v.15, pp. 9823-9857.

[232] KUMAR, S., GANDHI, K.S, KUMAR, R., 2007, "Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate Method," *Ind Eng Chem Res*., v.46, n.10 pp.3128–3136.

[233] BROWN, K.R., WALTER, D.G., NATAN, M.J., 2000, "Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. Improved control of particle size and shape," *Chem. Mater*., v.12, n.2, pp. 306-313.

[234] CHOW, M., ZUKOSKI, C., 1994, "Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability," *J. Colloid Interface Sci*., v.165, p.97.

[235] OLIVEIRA, F.M., 2017, "Síntese de nanopartículas anisotrópicas de ouro e sua avaliação como catalisadores na redução química do p-nitrofenol," M.Sc. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal do Alagoas, Maceió-AL.

[236] HUANG, C., BONROY, K., REEKMANS, G., LAUREYN, W., VERHAEGEN, K., *et al*., 2009, "Localized surface plasmon resonance biosensor integrated with microfluidic chip." *Biomedical Microdevices*, v.11, n.4, pp.893-901.

[237] KUMAR, D., SC, M., TECH, M., 2012, "Co-Functionalised Gold Nanoparticles for Drug Delivery Applications," DS.c., University of Minnesota Twin Cities. Disponível em: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30584.44800>. Acesso em: 22 fev. 2019.

[238] TANTRA, R., SCHULZE, P., QUINCEY, P., 2010, "Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility," *Particuology*, v.8, n.3, pp. 279–285.

[239] MURA, S., GREPPI, G., ROGGERO, P.P., MUSU, E., PITTALIS, D., CARLETTI, A., GHIGLIERI, G., IRUDAYARAJ, J., 2015, "Functionalized gold nanoparticles for the detection of nitrates in water," *International Journal of Environmental Science and Technology*, v.12, n.3, pp.1021-1028.

[240] SZYCHOWSKI, B., LENG, H., PELTON, M, DANIEL, M., 2018, "Controlled etching and tapering of Au nanorods using cysteamine," *Nanoscale*, v.10, n.16830.

[241] YOON, J.H., PARK, J.S., YOON, S., 2009, "Time-Dependent and Symmetry-Selective Charge-Transfer Contribution to SERS in Gold Nanoparticle Aggregates," *Langmuir*, v.25, n.21, pp.12475-12480.

[242] AMIN, M.U., ZHANG, R., LI, L., YOU, H., FANG, J., 2021, "Solution-Based SERS Detection of Weak Surficial Affinity Molecules Using Cysteamine-Modified Au Bipyramids," *Anal. Chem*. v.93, n.21, pp.7657-7664.

[243] KAUR, P., CHUDASAMA, B., 2018, "Effect of Colloidal Medium on the Shelf-Life and Stability of Gold Nanorods Prepared by Seed-Mediated Synthesis,"*J.Nanosci. Nanotechnol*, v.18, pp.1665-1674.

[244] ALDEWACHI, H., WOODROOFE, N., GARDINER, P., 2018, "Study of the Stability of Functionalized Gold Nanoparticles for the Colorimetric Detection of Dipeptidyl Peptidase IV," *Applied Sciences*, v.8, n.12, pp. 2589.

[245] OLIVEIRA, J.P., PRADO, A.R., KEIJOKL, W.J., ANTUNES, P.W.P., YAPUCHURA, E.R., GUIMARÃES, M.C.C., 2019, "Impact of conjugation strategies for targeting of antibodies in gold nanoparticles for ultrasensitive detection of 17β-estradiol," *Scientific Reports*, v.9, pp.13859.

[246] TEMUR, E., BOYACI, İ.H., TAMER, U., UNSAL, H., AYDOGAN, N., 2010, "A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for *Escherichia coli* enumeration," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.397, n.4, pp.1595-1604.

[247] PROAÑO-NARVAEZ, J.V., MEZA-LUCAS, A., MATA-RUIZ, O., GARCIA-JERONIM, O, R.C., CORREA, D., 2002, "Laboratory Diagnosis of Human Neurocysticercosis: Double-Blind Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Electroimmunotransfer Blot Assay," *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.6, pp.2115-2118.

[248] PINTO, P.S.A., VAZ A.J., GERMANO, P.M.L., NAKAMURA, P.M., 2000, "ELISA test for the diagnosis of cysticercosis in pigs using antigens of *Taenia solium and Taenia crassiceps cysticerci*," *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. v.42, pp71-79.

[249] MARINAKOS, S.M., CHEN, S., CHILKOTI, A., 2007, "Plasmonic Detection of a Model Analyte in Serum by a Gold Nanorod Sensor," *Analytical Chemistry*, v.79, n.14, pp.5278-5283.

[250] WANG, X., LI, Y., WANG, H., FU, Q., PENG, J., WANG, Y., DU, J., ZHOU, Y., ZHAN, L., 2010, "Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of hepatitis B virus in buffer, blood serum and plasma," *Biosensors and Bioelectronics*, v.26, pp.404-410.

[251] BAE, Y.M., JIN, S.O., KIM, I., SHIN, K.Y., HEO, D., KANG, D.G., 2015, "Detection of Biomarkers Using LSPR Substrate with Gold Nanoparticle Array," *Journal of Nanomaterials*, v.302816, n.2015.

[252] KIM, J., OH, S.Y., SHUKLA, S., HONG, S.B., HEO, N.S., BAJPAI, V.K., CHUN, H.S., JO, C.-H., CHOI, B.G., HUH, Y.S., HAN, Y.-K., 2018, "Heteroassembled gold nanoparticles with sandwich-immunoassay LSPR chip format for rapid and sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg)," *Biosensors and Bioelectronics*, v.107, pp.118-122.

[253] YU, C., IRUDAYARAJ, J., 2007, "Quantitative Evaluation of Sensitivity and Selectivity of Multiplex NanoSPR Biosensor Assays," *Biophysical Journal*, v.93, n.10, pp.3684-3692.

[254] ALCON, S., TALARMIN, A., DEBRUYNE, M., FALCONAR, A., DEUBEL, V., FALAMAND, M., 2002, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections," *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.2, pp. 376–381

[255] BIONDI, G.F., MUCCIOLO, R.G., NUNES, C.M., RICHTZENHAIN, L.J., 1996, "Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps metacestode*." *Vet. Parasitol*., v.64, pp.261-266.

[256] CHO, T.J., HACKLEY, V.A., 2018, "Assessing the chemical and colloidal stability of functionalized gold nanoparticles," *National Institute of Standards and Technology*, pp.1200-26.

Apêndice A – Publicações e participações em Congressos

A.1 ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA

1. ARCAS, A.S; JARAMILLO, L.; COSTA, N.S; ALLIL, R.C.S.B. e WERNECK, M.M, **(2021).** "Localized surface plasmon resonance-based biosensor on gold nanoparticles for *Taenia solium* detection." ***Applied Optics***, v.60, n. 26, pp.8137-8144.***Artigo recomendado pelo Editor com destaque científico.**

2. **ARCAS, A.S**., DUTRA, F.S., ALLIL, R.C.S.B., & WERNECK, M.M. **(2018)**. "Surface plasmon resonance and bending loss-based U-shaped plastic optical fiber biosensors." ***Sensors*** *(Switzerland)*, v.18, n.2, pp: 1-16. Disponível em: <https://doi.org /10.3390/s18020648>

A.2 CAPÍTULO DE LIVRO

WERNECK, Marcelo; LOPES, Rafaela; COSTA, Greice; RODRIGUES, Domingos; **Arcas, Ariadny**; Dutra, Fabio; QUEIROZ, Vanessa; Allil, Regina. "POF Biosensors Based on Refractive Index and Immunocapture Effect." *Smart Sensors, Measurement and Instrumentation*.1 ed. Heidelberg - Germany: Springer International Publishing, **2017**, v.21, pp. 69-93. *ISBN: 9783319426242.Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-4262 5-9_4 The combat against tropical diseases is becoming an increasingly*

A.3 OUTROS TRABALHOS

1. **ARCAS, A.S; JARAMILLO, L.; COSTA, N.S; ALLIL, R.C.S.B. e WERNECK, M.M. "**Localized surface plasmon resonance-based biosensor on gold nanoparticles for Taenia solium detection." **IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC), 16-19 maio 2022,** Ottawa, Canadá.

2. Ariadny da Silva Arcas, Alex Dante, Juan David Lopez, Cesar Cosenza Carvalho, Marco Antônio Lemos Miguel, Regina Célia da Silva Barros Allil and Marcelo Martin Werneck. "Probe for monitoring the refractive index and turbidity of craft beers during the fermentation process". ***OSA Optical Sensors and Sensing Congress***. 22-26 junho 2020, Hyatt Regency Vancouver, British Columbia, Canadá.

3. Ariadny da Silva Arcas, Alex Dante, César Carvalho, Marco Antônio Lemos Miguel, Regina Allil, Marcelo Werneck. "SPR, Transmittance and light scaterring sensors application to monitoring of beer fermentation processes". ***13° SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "O Futuro do Alimento"***, novembro de 2019, Campinas – São Paulo – Brasil.

4. ANDRADE, A.R.B.; **Arcas, Ariadny**; ALLIL, Regina C.; Werneck, M.M. Estudo da Funcionalização do PMMA para a imobilização de nanopartículas de ouro, 2018). Universidade Federal do ABC - UFABC; Cidade: São Bernardo do Campo; Evento: ***II SNNB - Simpósio Nacional de Nanobiotecnologia*****;** Inst. Promotora

/financiadora: Universidade Federal do ABC - UFABC. Disponível em: https://docs.wixstatic.com/ugd/ae27f5_660a717f024b40c8bfa49c.

5. **ARCAS, Ariadny**; ANDRADE, A. R. B.; COSTA, N.; ALLIL, Regina C.; Werneck, M.M. Nanopartículas e nanobastões de ouro para sensoriamento, 2018. UFABC - Universidade Federal do ABC; Cidade: São Bernardo do Campo; Evento: ***II SNNB - Simpósio Nacional de Nanobiotecnologia***. Disponível em: https://docs.wixstatic.com/ugd/ae27f5_660a717f024b405c 8bfa49c61641e82b.pdf.

6. ANDRADE, A. R. B.; **DA SILVA ARCAS, ARIADNY;** Werneck, M.M.; ALLIL, Regina C. Study of the functionalization of gold nanoparticles for pof biosensor applications, 2018. The Museum of Flight; Cidade: Seattle, Washington, USA; Evento: ***27th International Conference on Plastic Optical Fibers (POF2018)***. Disponível em: <https://pof2018.com/poster-session/>;

7. **Arcas, Ariadny**; Dutra, F.; Allil, Regina C.; Werneck, M.M.; Allil, A. S. "Fiber-Optic Sensor For Bacteria Detection, 2017". ***Brazilian Roadshow 2017 on German Research, Innovation & Higher Education in Photonic Health Technologies***, LIF – Laboratório de Instrumentação e Fotônica UFRJ; Cidade: RIO DE JANEIRO; Inst.promotora/financiadora: IPHT – Leibniz Institute of Photonic Technology.

8. **ARCAS, A.S**.; JARAMILLO, L.; COSTA, N.S.; ALLIL, R.C.S.B.; WERNECK, M.M. ""Nanobiossensor Para Detecção De *Taenia solium.*" **SINANO: II Simpósio de nanotecnologia do DF,** Distrito Federal-DF, 2021. Apresentação oral no formato "Pitch". Disponível em: https:/ /www.sinano.online/.

9. SANTOS, V.V.C.M.; **ARCAS, A.S.;** GRANATO, N.S.C.; LOPES, R.N.; ALLIL, R.C.S.B.; WERNECK, M.M.; SALGADO, A.M. "Biossensor a Fibra óptica Plástica em forma de "U" pelo efeito do LSPR para Detecção Rápida de Bactérias Redutoras de Sulfato." **23° Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)**, Gramados-RS, outubro 2021. Disponível em: http://cobeq.org.br/

10. **ARCAS, A.S**; Dante, A.; Lopez, J.D.; CARVALHO, C.C.; ALLIL, Regina C.; Werneck, M.M. "Probe for monitoring the refractive index and turbidity of craft beers during the fermentation process." **Optical Sensors and Sensing Congress 2020**. Washington, DC.: OSA, 2020. v.2020. pp.JTu2A.29, **ISBN: 978-1-943580-77-4, DOI: 10.1364/3D.2020.** Diponível em: https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI =3D-2020-JTu2A.29

11. Dante, A.; Lopez, J.D.; **ARCAS, Ariadny**; CARVALHO, C.C.; ALLIL, R.C.; Werneck, M.M. "An Open-Loop FBG-Based Magnetostrictive Current Sensor with Enhanced Sensitivity." ***OSA Optical Sensors and Sensing Congress 2020***, 2020, Washington, DC United States. v.2020. pp.STu4D.6, **ISBN:978-1-943580-78-1**, **DOI:10.1364/SENSORS.2020**. Disponível em: https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=Sensors-2020-STu4D.6

12. Lopez, J.D.; Dante, A.; **ARCAS, A.S**; CARVALHO, C.C.; ALLIL, R.C.; Werneck, M.M. "Study of Different Shapes in the Sensitivity of FBG-based Magnetostrictive Sensors withTerfenol-D Powder." **OSA Optical Sensors and Sensing Congress 2020**. Washington, DC.: OSA, 2020. v.2020. pp. STu4D.5, **ISBN: 978-1-**

943580-78-1, DOI: 10.1364/SENSORS.2020. Disponível em: https://www.osapublishing. org/abstract.cfm?uri=Sensors-2020-STu4D.5

13. **A.S.Arcas**, A. Dante, C.C.Carvalho, A.M.S. Werneck, R.C.B, Allil and M. Werneck. Sensors for beer fermentation on brewing process. ***28th International Conference on Plastic Optical Fibers (POF 2019)***, University Hiyoshi Campus, Yokohama, Japan.

14. WERNECK, Marcelo; **ARCAS, Ariadny**; LOPES, Rafaela; RODRIGUES, Domingos; COSTA, N.; Soares, L.; DUTRA, F.; KELLY, G.; LANDI, L.; WERNECK, A.; Allil, Regina. Plastic Optical Fiber Biosensors, 2017. Meliá Ria Hotel & Spa; Cidade: Aveiro Portugal; Evento: **26th International Conference on Plastic Optical Fibres**. Disponível em: <http://www.pof 2017.org/>.

15. **ARCAS, A.S**; ALLIL, Regina C.; WERNECK, Marcelo. "U-Shaped POF sensor coated with gold thin film for E. coli detection", 2017. ***26th International Conference on Plastic Optical Fibres*.** Aveiro: Instituto de Telecomunicações, 2017, v.26, pp.263. ISBN:9789899734524. Disponível em: <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/18859/1/proceedingsPOF2017.pdf>.