Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de *Escherichia coli* em água

Nathália Corrêa Chagas de Souza

Dissertação de Mestrado

Orientadores

Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Prof. Marcelo Martins Werneck, D.Sc.

Rio de Janeiro
2010

Nathália Corrêa Chagas de Souza

Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de *Escherichia coli* em água

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Prof.ª Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
Prof. Marcelo Martins Werneck, D.Sc.

Rio de Janeiro
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Nathália Corrêa Chagas de

Desenvolvimento de um imunosssensor para detecção de *Escherichia coli* em água / Nathália Corrêa Chagas de Souza. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

77 f.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010**.**

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado e Marcelo Martins Werneck.

1. *Escherichia coli*. 2. Biossensor. 3. Água. 4. Tese. (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Andréa Medeiros Salgado e Marcelo Martins Werneck. I. Título.

Nathália Corrêa Chagas de Souza

Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de *Escherichia coli* em água

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.
(orientador – presidente da banca)

Marcelo Martins Werneck, D.Sc.
(orientador)

Marco Antônio Lemos Miguel, D.Sc.

Sérgio Eduardo Longo Fracalanzza, D.Sc.

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

DEDICATÓRIA

Tempo e Amor

Qual austero gigante que nos guia,
Furioso e rude e, às vezes, triste e lento,
Passa o tempo, na Terra, como o vento,
Renovando-te a senda, cada dia.

Não desesperes, ante o céu nevoento,
Nem te abatas na estrada escura e fria,
Nascerão novas flores de alegria
Onde há charcos de angústia e sofrimento.

O tempo, o lar, a fonte, a flor e o ninho...
Tudo o tempo transforma, de mansinho,
Alterando-se em luz, penumbra e treva!

Guarda, porém, o amor puro e esplendente,
Que o nosso amor, agora e eternamente,
É o tesouro que o tempo nunca leva...

(João Coutinho)

À você querida amiga, querida mãe, dedico este trabalho que nasceu da idéia de muitos, mas principalmente de minha dedicação, que só foi possível devido a sua insistência e trabalho constantes. Hoje e sempre meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Uma jornada é feita de muitas dúvidas, incertezas, erros e acertos, mas também de muito auxílio, conselhos e observações que culminam na evolução do trabalho. Neste espaço gostaria de agradecer a todos que colaboraram para a elaboração deste projeto. Assim, meu muito obrigado é direcionado:

Ao meu orientador fofíssimo, Marco Miguel, que me apresentou este projeto e me auxiliou sempre que requisitado, com paciência e bom humor;

A Carolina Beres, nossa "Carol" que além de me ajudar com os experimentos proporcionol momentos de descontração na minha vida que me mantiveram mais confiante e estimulada, afinal "é isso aí..." rir faz muito bem;

Ao meu orientador Marcelo Werneck, que tirou minhas dúvidas em gráficos e equações diversas;

A representante feminina na orientação, minha orientadora Andréa Salgado, que me ouviu sempre com paciência e atenção;

A minha professora do coração, Maria Helena, sempre presente, preocupada e atenciosa e com grande contribuição na área de imunologia;

Ao alagoano mais carioca que eu conheço, Fábio de Nazaré, pela ajuda na elaboração das fibras e por tantos socorros prestados em horas diversas;

A equipe do Laboratório de Instrumentação e Fotônica, que me acolheu e incentivou ao longo destes anos, contribuindo em todas as etapas de produção do sistema e elaboração do sensor, especialmente ao Rafael Ribeiro, Fernando Maciel, Roberto Guimarães, Julio Baliosian, José Luís Neto e Taís dos Santos, assim como a equipe de apoio Cristiane de Carvalho, Lucilene Basílio e Viviane dos Santos;

A equipe do Laboratório de Microbiologia Alimentar pelas conversas e empréstimos, especialmente ao Antônio, sempre muito solícito e amigo;

A Sociedade Fluminense de Energia (Petrobras), devido à contribuição com auxílio financeiro, assim como o próprio Laboratório de Instrumentação e Fotônica;

Ao professor Ulysses e a Karem, que possibilitaram o processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura;

A Noêmia, do laboratório Herta Meyer, que possibilitou as imagens por microscopia eletrônica de varredura;

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituo de Metalurgia (Centro de Tecnologia);

Aos meus queridos amigos, que sempre procuraram entender minhas ausências e me incentivaram com elogios e sugestões, principalmente a Cíntia dos santos, minha Tíntia, que sempre me tira dos sufocos e engrandece com ensinamentos construtivos minha vida;

A minha família, que me transmitiu valores e conceitos que contribuíram para minha formação e me auxiliaram a concluir mais esta etapa de minha vida;

E finalmente, ao meu querido amigo e namorado que me auxiliou de diversas formas e que desperta em mim o desejo de ser uma pessoas melhor, curiosa e persistente;

A todos longos dias e belas noites.

LISTA DE REAGENTES

AGAR NUTRIENTE

Peptona - 5 g

Extrato de Carne - 3 g

Agar - 15 g

H_2O destilada - 1000 mL

CALDO BHI

Infusão de cérebro e coração bovino

Peptona

H2O

HEXAMETILENODIAMINA

1,6-Hexanodiamina ($C_6H_{16}N_2$) 10%

Diluído em tampão borato pH 11,5

GLUTARALDEÍDO

Pentane-1,5-dial ($C_5H_8O_2$) 2,5%

Diluído em tampão fosfato pH 7,4

TAMPÃO FOSFATO

NaH_2PO_4 31,96% pH 5,0

Na_2HPO_4 5,36% pH 10,0

Água destilada

TAMPÃO BORATO

Ácido Bórico (H_3BO_3) 0,3%

Tetraborato de sódio ($Na_4B_4O_7$) 1,9%

Água destilada

TAMPÃO CARBONATO DE SÓDIO

Solução A:

Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) 5,3%

Água destilada

Solução B:

Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$) 4,2%

Água destilada

SALINA 0,85%

Cloreto de sódio (NaCl) 0,85g

Água destilada

TAMPÃO CACODILATO

Na $(CH_3)_2$. AsO_2. 3 H_2O - 16,01 g

Água bidestilada – 500 mL

HCl fumegante 37% - 1,66 mL

TAMPÃO GBS

NaCl 9%

$CaCl_2$ 1%

Glicina 7,51%

Água deionizada

Ajustar para pH 8,2-8,4 com NaOH (1N)

CALDO EC

Triptona – 20 g/L

Lactose – 5,0 g/L

Sais Biliares – 1,5 g/L

Fosfato dibásico de potássio – 4,0 g/L

Fosfato monobásico de potássio – 1,5 g/L

Cloreto de sódio – 5,0 g/L

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

AAF – Fímbia s de aderência agregativa

Ag – Antígeno

Ac – Anticorpo

BFP – Pílus de formação agregativa

BHI – "Brain and Heart Infusion"

BSA – Soro albumina bovina

CFA – Antígeno de Fator de Colonização

DAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa com aderência difusa

DAF – Fator de Decadência de Aceleração

d_p- Profundida de penetração do campo evanescente

DTHA – Doença de transmissão hídrica e alimentar

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF – Fator de Aderência de EPEC

EAST1 – *Escherichia coli* ST1 enteroagregativa

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva

EMB – "Eosin Methilene Blue Agar"

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC – *Escherichia coli* enteotoxinogênica

Fab – Porção Constante do anticorpo

Fc – Porção Cristalizável do anticorpo

GBS – Tampão Salina Glicin Buffered salin

HMDA – Hexametileno diamina

IgG – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

LED – "Light Emitting Diode"

LT – Enterotoxina termolábil

M – molar

Mab – "Monoclonal Antobody"

MEV – Microscopia Eletrônica de varredura

MUG – 4-metil umbeliferil beta-D galactopiranosídeo

n – índice de refração

n^{o} – numero

NMP – Número Mais Provável

OnPG – Orto-nitrofenilgalactopiranosídeo

Pab – “Policlonal Antobody”

PCR – “Polimerase Chain Reaction”

pH – potencial hidrogeniônico

PIM – Polímeros de Impressão Molecular

PMMA – Metacrilato de Polimetila

POF – “Plastic Optical Fiber”

ST – Enterotoxina termoestável

STEC – *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga

Stx – Toxina Shiga

TF – “Tapered Fiber”

TIR –Reflexão Interna Total

TUF – “Tapered U-shaped Fiber”

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV- Ultravioleta

VMP – Valor Máximo Permitido

VRBA – “Violet Red Bile Lactose Agar”

RESUMO

Souza, Nathália Corrêa Chagas de. **Desenvolvimento de um imunossensor baseado em fibra óptica plástica para detecção de *Escherichia coli* em água.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o acesso à água potável é um dos fatores determinantes para a manutenção da qualidade de vida. De indubitável importância, sua utilização abrange desde processos industriais até reações fisiológicas, essenciais para a sobrevivência dos seres vivos. Porém, a água também representa uma das principais vias de carreamento de microrganismos patogênicos. A determinação de microrganismos indicadores, que normalmente compartilham espaço com os patogênicos, mostra-se mais simples e menos dispendiosa. Atualmente o principal microrganismo indicador utilizado é a bactéria *Escherichia coli*, de origem gastrintestinal. Sua presença no ambiente indica contaminação fecal na água, solo ou vegetais. Diversas metodologias têm sido descritas visando à detecção de microrganismos no ambiente, porém as técnicas propostas requerem no mínimo 24 horas para apresentarem resultados. Este intervalo pode resultar na contaminação de um grande número de pessoas, além de graves perdas econômicas. Os imunossensores são sensores que utilizam anticorpos para a detecção específica da substância a ser analisada. Estes representam uma tecnologia com grande potencial para atender à rapidez e sensibilidade exigida nestes casos, podendo, independentemente do estado fisiológico das células, propiciar detecções em tempo real. Assim, neste trabalho foi desenvolvido um imunossensor baseado em fibra óptica plástica (metacrilato de polimetila) para detecção de *Escherichia coli* em água. Em sua elaboração foi utilizada a bactéria *E. coli*, como célula alvo e outras enterobactérias como células controle. As fibras foram modificadas para formação de uma área sensível (“taper”), através de aquecimento e estiramento das mesmas, sendo as

medidas das fibras avaliadas e diferentes conformações (curvas ou retas) comparadas. A região sensível sofreu tratamento químico e posterior sensibilização utilizando-se anticorpos específicos para *E. coli*. A eficiência de ligação dos mesmos foi analisada por microscopia ótica e eletrônica, assim como através da avaliação do sinal obtido durante interação das fibras com as bactérias. O efeito de amplificação do sinal detectado com o uso de partículas de látex revestidas com anticorpos também foi avaliado, assim como a manutenção da estabilidade do sensor frente a diferentes fatores ambientais como temperatura, pH e dureza também foram estudados. Os resultados revelaram que ocorreu ligação dos anticorpos à fibra, e que o conjunto fibra - anticorpo foi capaz de ligar as bactérias de forma específica, que provocou variação do sinal, principalmente quando altas concentrações bacterianas foram avaliadas. A utilização de partículas de látex possibilitou o aumento do sinal e detecção de baixas concentrações bacterianas (10^3 células/mL), sugerindo a manutenção da eficiência dos anticorpos e do protocolo utilizado. As condições ambientais, que permitiram melhor detecção de *E. coli*, foram temperatura a 30°C e pH 7,0. A variação destes fatores, bem como o aumento da dureza, influenciou negativamente na ligação e detecção das bactérias pelo sensor.

Palavras-chave: Água. *Escherichia coli*. Imunossensor. Fibra óptica.

ABSTRACT

Souza, Nathália Corrêa Chagas de. **Development of an immunosensor based on plastic optical fiber for detection of *Escherichia coli* in water.** Rio de Janeiro, 2010. Master's Thesis (Postgraduate Studies in Technology of Chemical and Biochemical Processes) - School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

According to the World Health Organization, access to drinking water is a major factor for maintaining quality of life. Undoubtedly important, its use ranges from industrial processes to physiological responses, essential for the survival of living beings. However, water also represents a major carrier of pathogenic microorganisms. The determination of indicator microorganisms, which often share space with pathogenic strains, is simpler and less expensive. Currently, the main indicator strain used is *Escherichia coli* of gastrointestinal origin. Its environmental presence indicates fecal contamination in water, soil or plants. Several methods have been described aiming the detection of microorganisms in the environment, but the proposed techniques require at least 24 hours for results to be produced. This delay can result in contamination of a large number of people, and serious economic losses. Immunosensors are sensors that use antibodies for detection of the analyzed substances. These represent a technology with great potential to meet the speed and sensitivity required in these cases, regardless of the physiological state of cells, providing real-time detection. Thus, in this work we produced an immunosensor based on plastic optical fiber (polymethyl methacrylate) for detection of *Escherichia coli* in water. In its preparation was used *E. coli* as target cells and other enterobacteria as control cells. The fibers were modified to form a sensitive area ("taper"), through heating and stretching, evaluating different measurements and conformations (curved or straight). The region was submitted to chemical treatment and subsequent sensitization using specific *E. coli* antibodies. The antibody

binding efficiency was analyzed by light and electron microscopy, and also by evaluating the signal obtained by the fibers during interaction with bacteria. The amplification of this signal by latex particles coated with antibodies was also evaluated, as well as the stability of the sensor through different environmental factors such as temperature, pH and hardness. Results showed that antibody binding to the fiber occurred, and that the fiber-antibody set was capable of binding bacteria specifically, resulting in attenuation of the generated signal, especially when high bacterial concentrations were evaluated. The use of latex particles enabled signal increase and low bacterial concentrations detection (10^3 cells / mL), suggesting the maintenance of antibodies efficiency and of the protocol used. Environmental conditions which allowed better detection of *E. coli*, were temperature 30 ^{o}C and pH 7.0. The variation of these factors, as well as increased hardness, had a negative influence on binding and detection of bacteria by the sensor

Keywords: Water. *Escherichia coli*. Imunosensor. Óptical Fiber.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO **1**

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **3**

2.1. Importância da água no mundo **3**

2.2 Risco microbiológico relacionado ao consumo de água **3**

2.2.1. Organismos indicadores de contaminação **5**

2.2.2. Coliformes **6**

2.2.3. Coliformes totais **6**

2.2.4. Coliformes termotolerantes **7**

2.2.5. Escherichia coli **8**

2.2.6. Métodos de detecção de coliformes **13**

2.2.7. Métodos Convencionais **13**

2.2.8. Métodos Rápidos **15**

2.3. Biossensores **15**

2.3.1. Definição **15**

2.3.2. Breve Histórico dos Biossensores **17**

2.3.3. Características dos Biossensores **18**

2.3.4. Classificação dos Biossensores **19**

2.3.5. Tecnologia dos Biossensores **20**

2.3.6. Tipos de Interação **20**

2.3.7. Biossensores Biocatalíticos **20**

2.3.8. Biossensores de Bioafinidade **20**

2.3.9. Imunossensores **21**

2.3.10. Técnicas de Imobilização **24**

2.3.11. Sistemas de Transdução **24**

2.3.12. Transdutor Óptico **26**

2.3.13. Sensor de fibra óptica **26**

2.3.14. Formas de Exposição do Campo Evanescente **29**

2.3.15. Influência da geometria na sensibilidade e estabilidade dos sensores **30**

2.3.16. Aplicações dos Biossensores **30**

2.3.17. Mercado dos Biossensores **32**

3 - OBJETIVOS **35**

3.1. Objetivo Geral **35**

3.2. Objetivos Específicos 35
4 – MATERIAIS E MÉTODOS 36
4.1. Fibra óptica 36
4.2. Produção da região sensível da fibra 36
4.2.1. Equipamento e procedimento de estiramento 36
4.2.2. Fabricação das fibras em formato de U 37
4.3. Determinação da melhor conformação de fibra a ser utilizada 37
4.3.1. Caracterização das dimensões das fibras 38
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura 38
4.3.3. Sistema de medição 38
4.3.4. Avaliação da sensibilidade do "taper" produzido 39
4.4. Preparo da fibra para ligação dos anticorpos 40
4.4.1. Limpeza das fibras 40
4.4.2. Aminação da POF para ligação da proteína A 40
4.4.3. Ativação da superfície aminada da POF 41
4.4.4. Ligação covalente de proteína A ao PMMA 41
4.4.5. Bloqueio dos sítios inespecíficos da superfície da fibra 41
4.5. Ligação dos anticorpos à fibra 42
4.6.3. Avaliação das etapas do processo químico por Microscopia de Força Atômica 42
4.7. Ligação das bactérias à fibra 42
4.7.1. Estirpes bacterianas utilizadas 42
4.7.2. Procedimento de ligação das bactérias às fibras 42
4.8. Determinação da ligação das bactérias à superfície das fibras 43
4.8.1. Avaliação por Microscopia Óptica 43
4.8.2. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura 43
4.9. Avaliação da atenuação do sinal causada pela ligação das bactérias à fibra 43
4.10. Determinação da sensibilidade do sensor 44
4.11. Amplificação do sinal obtido pela ligação das bactérias ao sensor 44
4.11.1. Sensibilização de partículas de látex 44
4.11.2. Avaliação da capacidade de ligação das partículas às bactérias 44
4.11.3. Interação de partículas de látex com bactérias ligadas às fibras 44
4.12. Durabilidade dos anticorpos ligados à superfície das fibras 45
4.13. Avaliação do potencial de reciclagem dos sensores 45

4.14. Determinação da especificidade do sensor **45**

4.15. Interferência de fatores ambientais nos processos de ligação e detecção da bactéria **45**

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO **47**

5.1. Material utilizado como base para o imunossensor **47**

5.2. Avaliação da superfície das fibras por microscopia eletrônica de varredura **49**

5.3. Caracterização geométrica dos "tapers" **50**

5.4. Análise da sensibilidade das fibras a diferentes índices de refração **52**

5.5. Análise da estabilidade de leitura **55**

5.6. Avaliação dos efeitos do tratamento químico e ligação de anticorpos na superfície das fibras por microscopia de força atômica **58**

5.7. Confirmação de ligação de bactérias à superfície das fibras **59**

5.8. Avaliação da atenuação de sinal por suspensões bacterianas **61**

5.8.1. Amplificação da atenuação de sinal **61**

5.9. Determinação do tempo de atividade dos anticorpos em pregados **62**

5.10. Reaproveitamento de fibras com o religamento de anticorpos **63**

5.12.Avaliação da especificidade do sensor **64**

5.13.Avaliação de interferentes ambientais no processo de leitura **65**

6 - CONCLUSÕES **68**

7 - SUGESTÕES **70**

8. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **71**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Surtos de doenças com origem hídrica e alimentar segundo o agente etiológico, Brasil 1999 – 2008 **4**
Figura 2 Surtos de doenças com origem hídrica e alimentar segundo mês e região. Brasil, 1999 – 2008 **5**
Figura 3 Esquema de *E. coli* diarreiogênicas patogênicas **10**
Figura 4 Esquema de estruturas de superfície da bactéria *E. coli* **12**
Figura 5 Esquema geral de funcionamento de um biossensor **16**
Figura 6 Esquema da estrutura básica do anticorpo IgG **22**
Figura 7 Ligação dos anticorpos IgG à superfície da fibra **22**
Figura 8 Subunidade molecular do metacrilato de polimetila (PMMA) **27**
Figura 9 Fenômeno da Reflexão Interna Total **28**
Figura 10 Representação esquemática do processo de estiramento da fibra óptica **29**
Figura 11 Valores para o mercado de biossensores e bioeletrônicos até 2009 **32**
Figura 12 Expansão do mercado para nano biossensores **33**
Figura 13 Estiramento da fibra óptica **36**
Figura 14 Diagrama de blocos de operação da máquina de estiramento **37**
Figura 15 Ilustrações referentes às fibras após estiramento e dobra **38**
Figura 16 Sistema de medição e leitura empregado para avaliação do sensor **39**
Figura 17 Acopladores utilizados para as fibras apenas estiradas **39**
Figura 18 Representação esquemática das reações químicas envolvidas na aminação do PMMA **41**
Figura 19 Representação esquemática das reações químicas envolvidas na formação de ligação entre o composto aminado e o glutaraldeído **41**
Figura 20 Fibras após processo de tração sob aquecimento **47**
Figura 21 "Taper" formado na fibra óptica plástica **48**
Figura 22 "Taper" formado na fibra óptica. Esquema sugerindo diminuição da casca **48**
Figura 23 Estrutura da fibra óptica em formato de U **49**
Figura 24 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, fibras esticadas **50**

Figura 25 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, fibras dobradas **50**
Figura 26 Determinação da sensibilidade dos sensores, fibras esticadas **52**
Figura 27 Determinação da sensibilidade dos sensores, fibras dobradas **53**
Figura 28 Fibras esticadas, com "tapers" variando de 11 mm a 15 mm de comprimento **54**
Figura 29 Fibras dobradas, com "tapers" variando de 11 mm a 15 mm de comprimento **54**
Figura 30 Análise da estabilidade de leitura da fibra esticada Q-2 frente a diferentes índices de refração **55**
Figura 31 Análise da estabilidade de leitura da fibra dobrada N-28 frente a diferentes índices de refração **56**
Figura 32 Relação da tensão obtida em função dos diferentes índices de refração utilizados, fibras esticadas **57**
Figura 33 Relação da tensão obtida em função dos diferentes índices de refração utilizados, fibras dobradas **57**
Figura 34 Fases de tratamento das fibras observadas por microscopia de força atômica **59**
Figura 35 Imagem por microscopia ótica de ligação de *E.coli,* à superfície da fibra **60**
Figura 36 Visualização de bactérias *E. coli* ligadas à superfície da fibra por microscopia eletrônica de varredura **60**
Figura 37 Determinação da sensibilidade do imunossensor frente às concentrações 10^4 e 10^3 células de *E. coli*/mL **61**
Figura 38 Amplificação do sinal através da utilização de partículas de látex **62**
Figura 39. Determinação da atividade dos anticorpos ligados ao imunossensor ao longo das semanas **63**
Figura 40 Reaproveitamento de fibras com a religação de anticorpos **63**
Figura 41 Avaliação da especificidade do sensor na presença de culturas bacterianas puras **64**
Figura 42 Avaliação da especificidade do sensor na presença de culturas bacterianas mista. **65**
Figura 43 Avaliação do sensor frente a variações do fator dureza da água **66**

Figura 44 Avaliação do sensor frente a variações do fator temperatura **66**
Figura 45 Avaliação do sensor frente a variações do fator pH **67**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Número de surtos de doenças transmitidas por alimentos, segundo categoria do agente etiológico, PR (1978 - 2000) **3**

Tabela 2 Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano **7**

Tabela 3 Critérios de classificação dos biossensores **19**

Tabela 4 Principais vantagens e desvantagens dos anticorpos aplicados aos biossensores **23**

Tabela 5 Tipos de transdutores empregados em biossensores **25**

Tabela 6 Mercado Potencial de Aplicação dos Biossensores **31**

Tabela 7 Quadro de índices de refração obtidos com diferentes concentrações de sacarose **40**

Tabela 8 Medidas obtidas através do software ImageProPlus® de fibras com diferentes geometrias **51**

1: INTRODUÇÃO

A água é essencial para a manutenção da vida, assim como para as atividades da indústria e agricultura. Sabe-se sua qualidade e segurança são pontos de grande importância na saúde pública (LIGUORI *et al*, 2010), uma vez que esta pode ser considerada um dos principais veículos de contaminantes físicos, químicos (NIELSEN**,** KUEHN & MUELLER, 2010**;** ROHDEN *et al.*, 2009) e microbiológicos (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009), causando graves injúrias ou até mesmo a morte (LIGUORI *et al.*, 2010; MARSHALL *et al.*, 2006). Como exemplo, a gastrenterite aguda é considerada a principal causa de morbidade e mortalidade infantil nos países em desenvolvimento (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009). A importância da qualidade da água na vida dos seres humanos é profundamente analisada e fica clara em estudos como de VOLPE *et al* (2009), que aborda o impacto de fatores, como o acesso à água potável, na queda da mortalidade infantil no Estado do Rio de Janeiro.

A presença da bactéria *Escherichia coli* no ambiente, na água, solo e vegetais está associada à contaminação fecal, uma vez que este microrganismo habita exclusivamente o trato gastrointestinal de animais de sangue quente (SCOTT *et al.*, 2002). Assim, este microrganismo pode ser indicativo da potencial presença de outros microrganismos, inclusive de enteropatógenos, uma das razões para sua atual utilização como principal indicador da qualidade da água. Apesar da bactéria *E. coli* e seus hospedeiros normalmente coexistirem de forma harmoniosa e com benefícios mútuos, a ocorrência deste microrganismo em áreas do corpo que não apresentam microbiota, como sangue, líquor, urina e cavidades, pode gerar quadros infecciosos graves. Além disso, existem cepas que, por haverem adquirido atributos específicos de virulência, podem causar um grande espectro de doenças, inclusive extra-intestinais (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

Embora existam os chamados métodos rápidos para diagnóstico em microbiologia, atualmente os principais métodos de detecção de microrganismos em água, requerem um longo tempo de análise. Estes podem levar de 1 a 7 dias para a liberação dos resultados, além da necessidade de equipamentos e mão de obra qualificada (LIM *et al.*, 2003).

Uma vez que para a prevenção de problemas graves no uso da água é essencial o diagnóstico rápido, existe a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de metodologias que forneçam resultados em menor tempo. Desta forma, os biossensores grassam neste cenário apresentando características outras, como baixo custo, sensibilidade e possibilidade de miniaturização (FREIRE, DURÁN & KUBOTA., 2002).

O funcionamento de um biossensor, de uma forma geral, envolve a alta sensibilidade do componente biológico ao substrato de interesse. Como produto desta interação, ocorrem variações de um ou mais parâmetros físico-químicos, que são convertidos em um sinal elétrico mensurável, que é processado pelo uso de um transdutor adequado (DANIELSSON *et al.*, 1981). A combinação dos diversos tipos de componentes biológicos e transdutores permite a elaboração de biossensores capazes de identificar múltiplas substâncias, inclusive com alta especificidade, como é o caso dos imunossenores, que utilizam anticorpos como componente biológico. Desta forma, o uso destes equipamentos apresenta um grande potencial para o monitoramento ambiental, diagnóstico clínico e indústria alimentícia (DINH *et al.*, 1993; MARAZUELA & BONDI., 2002; WOLFBEIS *et al.*, 2004).

Problemas de estabilidade e a falta de credibilidade dos biossensores para aplicação em algumas áreas são ainda grandes desafios que contribuem para a escassez destes instrumentos no mercado. No entanto, esforços têm sido realizados buscando melhorar a confiança de modo a obter um sensor com o desempenho desejado em termos de sensibilidade, alcance dinâmico e reprodutibilidade (SILVA *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a elaboração de um imunossensor, baseado em fibra óptica plástica, visando a detecção da bactéria *Escherichia coli*, de forma seletiva e reprodutível, em um curto tempo, menos de 60 minutos.

2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância da água no mundo

O acesso à água de qualidade é um aspecto primordial para a boa saúde humana (OMS, 2006; SEINO *et al*, 2008; LIGUORI *et al*, 2010), apesar de mais de 1 bilhão de pessoas não serem beneficiadas com água potável para consumo (ILLMAN, 2006). Segundo estudos, este é um fator diferencial que influenciou na diminuição da mortalidade infantil nos estados brasileiros, bem como na mortalidade pós-neonatal, entre os anos de 2000 e 2005 (VOLPE *et al*, 2009). O fornecimento de água de boa qualidade versa como um dos tópicos dos "Objetivos de Desenvolvimento do Milênio", desenvolvidos pela ONU (ONU, 2002), dada sua importância e necessidade de avaliação, especialmente nos países em desenvolvimento. Isto se deve ao seu potencial de veiculação principalmente de contaminantes químicos (BLOOMFIELD *et al.*, 2006, MARSHALL *et al.,* 2006), bacterianos (FAWELL & NIEUWENHUIJSEN, 2003), além de outras causas como agentes virais e protozoários, conforme mostrado na Tabela 1.

TABELA 1 - Número de surtos de doenças transmitidas por alimentos, segundo categoria do agente etiológico, PR (1978 - 2000).

Categoria do agente	Número de surtos	%
Bacterianos	1195	59,8
Químicos	122	6,1
Outras causas	683	34,1
Total	2000	100,0

Adaptado de AMSON, HARACEMIV & MASSON, (2006).

2.2. Risco microbiológico relacionado ao consumo de água

Estima-se que aproximadamente 6000 crianças morrem diariamente por doenças transmitidas pela água (ILLMAN, 2006). Doenças infecciosas, especialmente diarréia, continuam a dominar o cenário global (WHO, 2010), cerca de 1,8 milhões de pessoas morrem de diarréia a cada ano, estando esta relacionada principalmente ao consumo de água mal ou

não tratada (SEINO *et al*, 2008). A água também é responsável pela transmissão de diversas outras doenças que podem tanto incapacitar quanto matar os indivíduos, como as gastrenterites agudas (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009). As possíveis conseqüências para a saúde, da contaminação microbiana da água, são tais que seu controle deve sempre ser encarado como de importância primordial e nunca ser comprometido (WHO, 2010). Contaminantes microbiológicos como bactérias (MARSHALL *et al.*, 2006; ROHDEN *et al.*, 2009), vírus (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009) e protozoários (OUATTARA *et al*, 2010) são veiculados especialmente através do consumo de água (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO, 2010). Tais disseminações podem ser aumentadas pelas mudanças climáticas (DELPLA *et al*, 2009). Na Figura 1 podem ser observados os principais agentes etiológicos causadores de surtos de transmissão hídrica e alimentar (DTHA), entre os anos 1999 e 2008, segundo o Ministério da Saúde (2008).

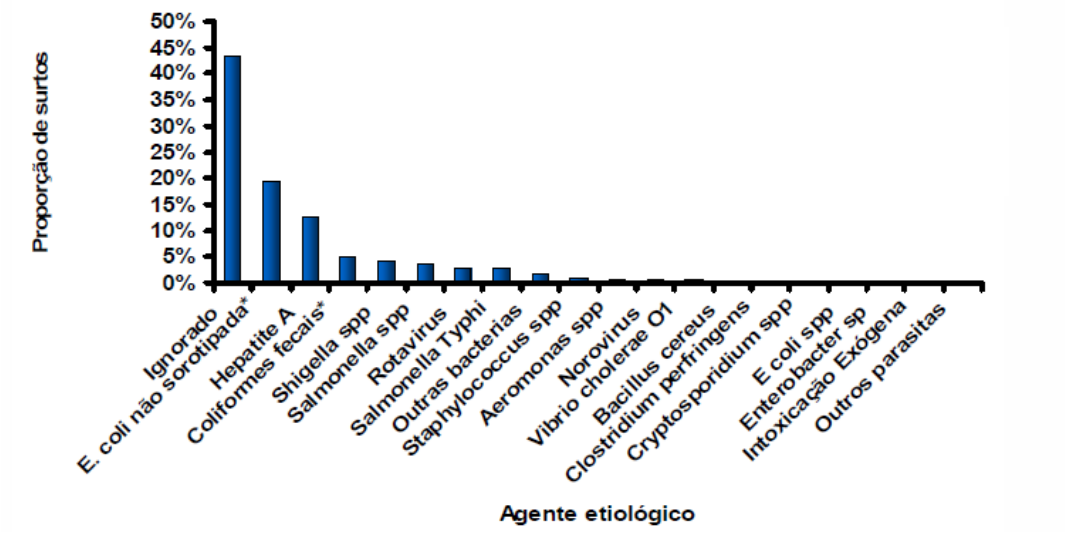

FIGURA 1 - Surtos de doenças com origem hídrica e alimentar segundo o agente etiológico, Brasil 1999 – 2008**. ***Necessidade de identificação de sorotipo.

Adaptado de: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_agua_10.pdf.

Os surtos de DTHA no Brasil podem ser divididos por regiões (Figura 2), entre os anos 1999 e 2008 houve uma incidência de 6874 casos/100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008)

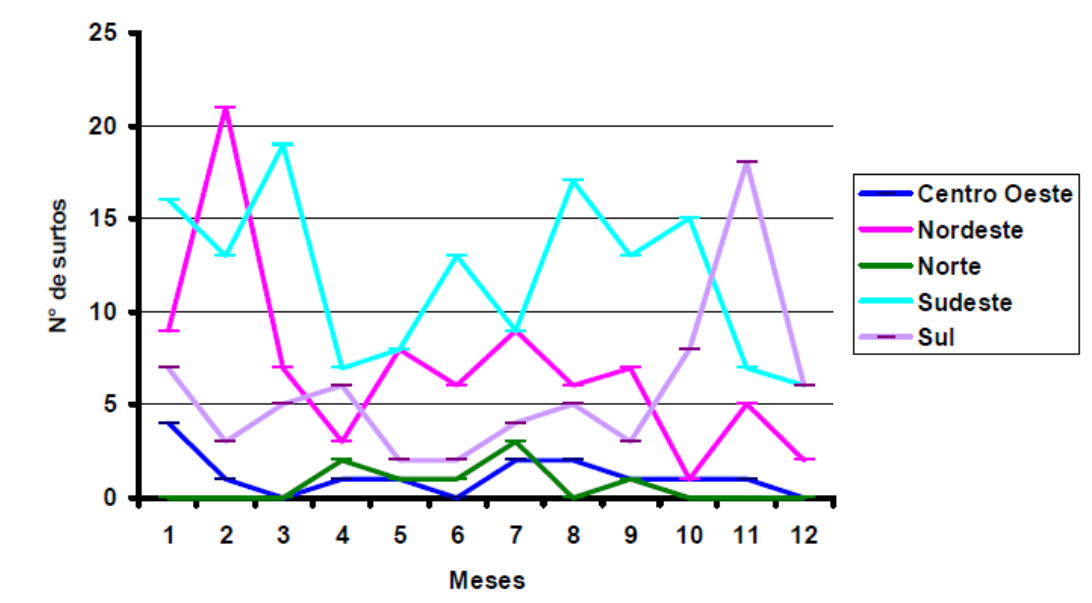

FIGURA 2 – Surtos de doenças com origem hídrica e alimentar segundo mês e região. Brasil, 1999 – 2008**.** Adaptado de http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_agua_10.pdf.

Segundo a Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde, é considerada água potável aquela que atende parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos e que não ofereça risco a saúde humana. A mesma prevê que o parâmetro adotado para a determinação de contaminação microbiológica em águas é a deliberação de microrganismos indicadores, classificados como coliformes totais e termotolerantes (à 45ºC), sendo que o segundo grupo deve estar ausente (BASTOS *et al.*, 2000; BRASIL, 2004).

2.2.1. Organismos indicadores de contaminação

A detecção e identificação dos diferentes patógenos na água é, via de regra, morosa, complexa e onerosa. Por essa razão, tradicionalmente recorre-se à identificação dos organismos indicadores de contaminação, na interpretação de que sua presença possa apontar o contato do meio analisado com matéria de origem fecal (humana ou animal) e, portanto, o risco potencial da presença de organismos patogênicos, que em sua maioria são encontrados no intestino (BRASIL, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) os organismos indicadores devem apresentar características como:

• ser de origem exclusivamente fecal;

• apresentar maior resistência que os patogênicos aos efeitos adversos do meio ambiente e aos processos de tratamento;

• apresentar-se em maior número que os patogênicos;

• ser de fácil identificação;
• não se reproduzir no meio ambiente.

No caso de nenhum microrganismo satisfazer simultaneamente a todas essas condições, deve-se trabalhar com o melhor indicador, isto é, aquele que apresente a melhor correlação com os riscos de saúde associados à contaminação de um determinado ambiente.

2.2.2. Coliformes

Em 1855, Theodor Escherich isolou uma bactéria em fezes de crianças, a qual recebeu a denominação original de *Bacterium coli* e mais tarde foi confirmada como habitante do trato intestinal de seres humanos e animais de sangue quente, sendo denominada *Escherichia coli*, em homenagem póstuma a seu descobridor (SHULMAN, FRIEDMANN & SIMS, 2007). No desenvolvimento do conceito de organismos indicadores de contaminação e de sua aplicação na avaliação da qualidade sanitária, de ambientes e de produtos de consumo humano, por muito tempo prevaleceu o emprego da *Escherichia coli*. Entretanto, a busca por agilidade e simplicidade deu lugar à utilização disseminada dos "coliformes" e, mais tarde, dos termotolerantes, diferenciados pelo teste de termotolerância introduzido por EIJKMAN em 1904 (*apud* BASTOS *et al*, 2000).

2.2.3. Coliformes totais

São bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, não produtores da enzima citocromo oxidase, capazes de desenvolver-se na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído à 35,0 ± 0,5 ^{o}C em 24 a 48 horas. Estes microrganismos podem apresentar atividade da enzima ß-galactosidase. Estão presentes no intestino humano e de animais de sangue quente e são eliminadas nas fezes em números elevados (10^6 – 10^8 células/g). A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter, Klebsiella e Enterobacter*. Vários outros gêneros e suas espécies podem apresentar um comportamento compatível com o grupo dos coliformes, podendo apresentar ou não uma origem exclusivamente fecal. Por isso, na avaliação da qualidade de águas naturais, os coliformes totais têm valor sanitário limitado. Sua aplicação restringe-se praticamente à avaliação da qualidade da água tratada, na qual sua presença pode indicar falhas no tratamento, uma possível contaminação após o tratamento ou ainda a presença de nutrientes em excesso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006.), conforme mostrado na Tabela 2. Além disso,

principalmente em climas tropicais, os coliformes apresentam capacidade de se multiplicar na água (OMS, 2006).

TABELA 2 - Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano

PARÂMETRO	VMP (a)
Água para consumo humano (b)	
Escherichia coli ou coliformes termotolerantes (c)	Ausência em 100ml
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100ml
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
Escherichia coli ou coliformes termotolerantes (c)	Ausência em 100ml
Coliformes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100ml em 95% das amostras examinadas no mês; Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100ml.

Fonte: portaria nº. 518, de 25 de Março de 2004, do Ministério da Saúde, Brasil, 2004. (a) Valor Máximo Permitido. (b) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras. (c) a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

A análise da presença dos coliformes também é utilizada para a determinação de padrões microbiológicos de águas com outras destinações como balneabilidade, recreação de contato primário: natação, mergulho, esqui-aquático, entre outros (BRASIL, 2001), e cultivo de hortaliças (ANVISA, 2001).

2.2.4. Coliformes termotolerantes

O grupo dos coliformes termotolerantes, anteriormente descritos como coliformes fecais, é um subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose com produção de gás a 44,5 ± 0,2 ^{o}C em 24 horas. Compreende o gênero *Escherichia* e, em menor extensão, espécies de *Klebsiella, Citrobacter* e *Enterobacter*. Apesar da denominação, o grupo acaba também por incluir bactérias de origem não exclusivamente fecal, embora em proporção bem menor que a do grupo dos coliformes totais. Uma vez que algumas espécies são encontradas em águas ricas em matéria orgânica ou efluentes industriais, a utilização dos coliformes fecais na avaliação da qualidade de águas naturais, principalmente em países de

clima tropical, também tem sido questionada (OMS, 2006). Apesar disso e com base no fato de que entre os cerca de 10^6-10^8 coliformes fecais/100 mL, usualmente presentes nos esgotos sanitários, predomina a *Escherichia coli* (bactéria de origem exclusivamente fecal), esses organismos ainda têm sido largamente utilizados como indicadores de poluição de águas naturais. É pouco provável que os "coliformes fecais" se desenvolvam em sistemas de distribuição, a menos que exista abundância de nutrientes, que ocorra pós-contaminação, que a temperatura da água tratada seja inferior a 13 ^{o}C e que não exista cloro residual livre (OMS, 2006).

2.2.5. Escherichia coli

A relação hospedeiro-microbiota em um indivíduo saudável corresponde a uma simbiose homeostática, na qual os hospedeiros proveem à microbiota nutrientes e um ambiente estável, enquanto a microbiota o assiste com a maturidade do sistema gastrointestinal, ativando o sistema imune, oferecendo alguma proteção contra espécies invasoras, além de contribuir nutricionalmente, por exemplo, com a produção de vitaminas (LESER & MØLBAK, 2009).

A bactéria *Escherichia coli* encontra-se na camada mucosa do cólon dos mamíferos, é o microrganismo anaeróbio facultativo predominante na microbiota intestinal humana (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). Distingue-se dos demais coliformes por possuir as enzimas ß-galactosidase e ß-glucoronidase; fermenta a lactose e o manitol com a produção de ácido e gás e produz indol a partir de triptofano a 44,5 ± 0,2 ^{o}C em 24 horas; não produzem a enzima citocromo oxidase e não-hidrolisam a uréia (OMS, 2006). Algumas cepas crescem à 37 ^{o}C, outras não fermentam a lactose (cerca de 10%) ou são indol-negativas (cerca de 3%-5%) (OMS, 2006).

Este microrganismo coloniza o trato gastrointestinal do recém nascido em suas primeiras horas de vida, desta forma, o sistema imune humano é altamente tolerante à *E. coli* (NATARO, 2004). Porém, em indivíduos debilitados, imunossuprimidos ou quando a barreira gastrintestinal é violada, até mesmo bactérias comensais, como é o caso da *E. coli*, podem causar infecções, como peritonites, inflamações do peritônio (NATARO & KAPER, 1998; KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

Além disso, existem vários clones de *E. coli* adaptados, que adquiriram atributos de virulência específicos. Essas características conferem uma maior capacidade de adaptação a novos nichos e permite-lhes causar um amplo espectro de doenças nos seres humanos. Freqüentemente codificado por elementos genéticos, esses atributos de virulência podem criar

novas combinações de fatores de virulência. Sendo que apenas as combinações mais bem sucedidas de fatores de virulência persistem, tornando-se 'patótipos' específicos de *E. coli*, capazes de causar doença em indivíduos saudáveis (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). Existem pelo menos 6 patótipos de *E. coli* capazes de induzir doenças entéricas (NATARO, 2004), as infecções originárias do patógeno *E. coli* podem estar limitadas à mucosa ou disseminadas pelo organismo. Existem 3 síndromes clínicas principais associadas às cepas patogênicas de *E. coli*: infecção do trato urinário, sepse/meningite e entérica/diarréias (NATARO & KAPER, 1998). Este último grupo, de *E. coli* diarreiogênicas, é dividido e classificado baseando-se em seus fatores de virulência. Os grupos patogênicos incluem *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatôgenica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* com aderência difusa (DAEC) além de outros possíveis grupos ainda não bem caracterizados (KAPER, NATARO, MOBLEY, 2004). Segundo os principais resultados dos estudos *in vitro* as formas de atuação destes grupos patogênicos podem ser descritas abaixo e são representadas na Figura 3:

EPEC adere aos enterócitos do intestino delgado, mas destrói a arquitetura normal das microvilosidades, induzindo lesões características. O desarranjo citoesquelético é acompanhado por resposta inflamatória e diarréia. Adesão inicial. Translocação de proteína por secreção do tipo III. Formação de pedestal (Figura 3a).

EHEC induz lesões semelhantes, mas no cólon. O que distingue as EHEC é a produção da toxina Shiga (Stx) (Figura 3b).

De forma similar, ETEC adere aos enterócitos do intestino delgado e induz diarréia aquosa por secreção das enterotoxinas termolábel (LT) e termoestável (ST) (Figura 3c).

EAEC adere ao epitélio dos intestinos grosso e delgado em um fino biofilme, secretando entero e citotoxinas (Figura 3d).

EIEC invade as células epiteliais do cólon, lisa o fagossoma e se move pelas células através dos microfilamentos de actina. A bactéria pode se mover lateralmente através do epitélio de uma célula pra outra, ou pode sair e entrar novamente através da membrana baso-lateral (Figura 3e).

DAEC provoca um efeito característico de transdução de sinal em enterócitos do intestino delgado descrito como o crescimento de projeções celulares tipo longos dedos, que envolvem a bactéria. AAF, fímbrias de aderência agregativa; BFP, pílus de formação agregativa; CFA, antígeno do fator de colonização, DAF, fator de decadência de aceleração; EAST1, *E. coli* ST1 enteroagregativa (Figura 3f).(KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004).

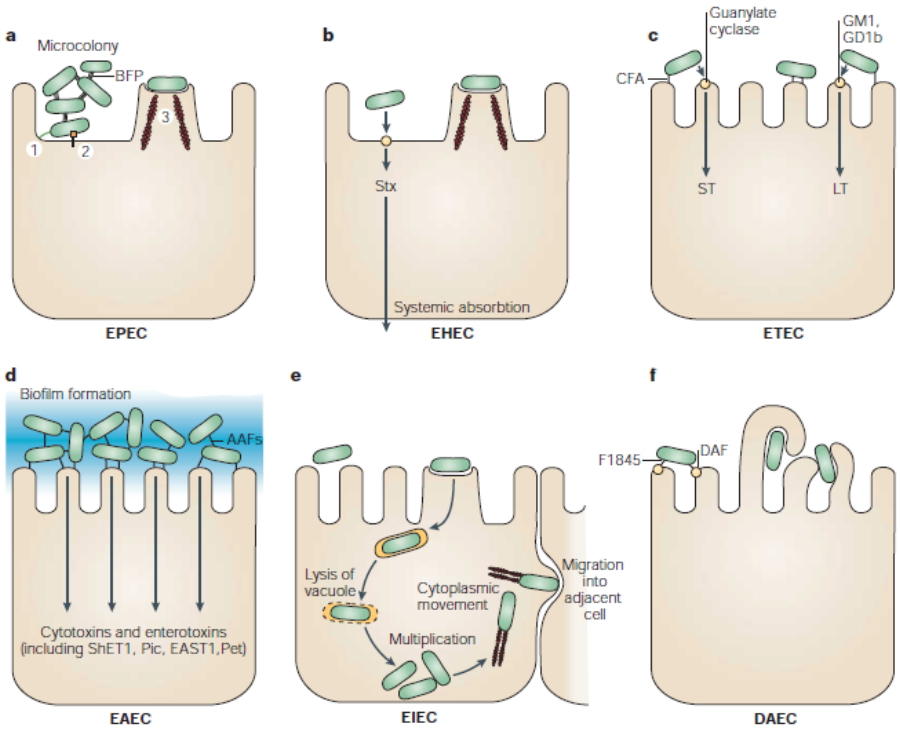

Figura 3 – Esquema de *E. coli* diarreiogênicas patogênicas. Representação das seis categorias de *E. coli* diarreiogênicas reconhecidas, cada uma apresenta ferramentas únicas executadas nas interações com as células eucarióticas. Adaptado de KAPER, NATARO & MOBLEY (2004).

Dos grupos patogênicos apresentados apenas os quatro primeiros tem sido citados como contaminantes de alimentos e água:

ETEC é conhecida como agente causador da "diarréia dos viajantes", doença caracterizada por diarréia aquosa com pouca ou nenhuma febre. Infecções por ETEC são comuns em países em desenvolvimento, mas em países como os Estados Unidos tem sido implicados em surtos esporádicos de doenças transmitidas por água, assim como ao consumo de queijos de consistência pastosa, comidas mexicanas e vegetais crus. A patogênese da ETEC está relacionada à produção de várias enterotoxinas como a enterotoxina termolábil (LT) que é muito semelhante em tamanho (86 kDa), sequência, antigenicidade e função para a toxina da cólera (CT). ETEC também pode produzir uma toxina termoestável (ST) que é de baixo peso molecular (kDa 4) e resistente à ebulição durante 30 minutos.

Existem diversas variantes de ST, como ST1a ou STP encontrado em *E. coli* isoladas de seres humanos e animais, enquanto ST1b ou STh é predominante em humanos. A dose infectante de ETEC para adultos foi estimada em pelo menos 10^8 células, mas os jovens, os idosos e os doentes podem estar sujeitos a níveis inferiores. Por causa de sua alta dose

infecciosa, a análise de ETEC normalmente não é realizada a menos que níveis elevados de *E. coli* sejam encontrados em um alimento.

EIEC assemelham-se a bactérias do gênero *Shigella* e causam uma forma de diarréia humana disentérica. Assim como *Shigella*, não se conhece reservatórios animais, a principal fonte de EIEC parece ser humanos infectados. Embora a dose infectante de *Shigella* seja baixa, de 10 a algumas centenas de células, estudos utilizando voluntários mostrou que pelo menos 10^6 células de EIEC são necessárias para causar a doença em adultos saudáveis (.....). Ao contrário de *E. coli* típicas, EIEC não são móveis, não descarboxilam lisina e não fazem a fermentação da lactose, então eles são anaeróbios. A patogenicidade de EIEC se deve principalmente a sua capacidade de invadir e destruir o tecido do cólon. O fenótipo invasão, codificado por um plasmídio de peso molecular elevado, pode ser detectado por testes de invasão usando culturas de células HeLa ou Hep-2 ou por PCR e sondas específicas para os genes que possibilitam a invasão.

EPEC provoca uma diarréia aquosa profusa e é uma das principais causas de diarréia infantil nos países em desenvolvimento. Surtos de EPEC têm sido associados ao consumo de água contaminada, bem como alguns derivados de carne. Através de estudos a dose infecciosa de EPEC em adultos saudáveis foi estimada em 10^6 células. A patogênese de EPEC envolve a proteína intimina (codificada pelo gene *eae*), que provoca lesões, mas também envolve uma proteína codificada por plasmídeo denominada fator de aderência de EPEC (EAF), que permite a aderência específica de bactérias às células intestinais. A produção de EAF pode ser demonstrada em culturas de células Hep-2 e a presença do gene *eae* pode ser verificada por PCR.

EHEC são reconhecidos como a principal causa de colite hemorrágica (HC) ou diarréia sanguinolenta, que pode progredir para a potencialmente fatal, síndrome hemolítico-urêmica (SHU). EHEC são tipificados pela produção de verotoxina ou toxinas Shiga (Stx). Embora Stx1 e Stx2 são mais frequentemente implicados em doença humana, há diversas variantes de Stx2. Existem vários sorotipos de *E. coli* produtoras de Stx (STEC), mas apenas aqueles que tenham sido clinicamente associados com HC são designados como EHEC. Destes, O157:H7 é um típico EHEC, sendo frequentemente implicado em doenças no mundo inteiro. A dose infecciosa para O157: H7 é estimada entre 10 e 100 células, mas nenhuma informação está disponível para outros sorotipos de EHEC. Infecções por EHEC são originadas principalmente a partir de alimentos como carne moída cozida, leite cru,

sanduíches frios, suco de maçã não pasteurizado, brotos de verduras e água contaminada. A produção de Stx1 e Stx2 pode ser testada por ensaios de citotoxicidade em culturas de células Vero e HeLa ou por ELISA, assim como por PCR específico para Stx1 e Stx2.

Além da classificação por patotipos as cepas de *E. coli* também podem ser avaliadas sorológica ou antigenicamente, baeando-se no fato de cada variante expressar diferentes antígenos em sua superfície. Kauffmann (1947) classificou os sorotipos de E. coli conforme alguns antígenos de superfície apresentados por estas bactérias. O antígeno somático (O, antígeno do lipopolissacarídeo - LPS) é um polissacarídeo termoestável (suporta 121ºC por 2 horas), presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas. O antígeno capsular (K) refere-se aos polissacarídeos capsulares que envolvem a parede celular, entretanto 31 deles não tem natureza polissacarídica. O antígeno flagelar (H) possue estrutura de natureza protéica e é termolábil (suporta 100º por 30 minutos). E o antígeno relacionado às fímbrias (F), ilustrados na Figura 4 Os grupos sorológicos O e H são normalmente utilizados em estudos epidemiológicos (ORSKOV & ORSKOV, 1992).

As diferentes cepas de *E. coli* tendem a se dividir em grupos clonais caracterizados por seus antígenos de superfície, Podem ser definidos em sorogrupos, quando apenas o antígeno O é avaliado, mais de 170 sorogrupos já foram identifcados, ou sorotipos, quando os antígenos O e H, e algumas vezes o K, são considerados (KAPER, NATARO & MOBLEY, 2004). A classificação sorológica é importante, pois é sabido que cada sorogrupo e sorotipo possui características individuais quanto a resposta contra antibióticos ou com relação a patogenicidade (BRITO *et al.*, 2004).

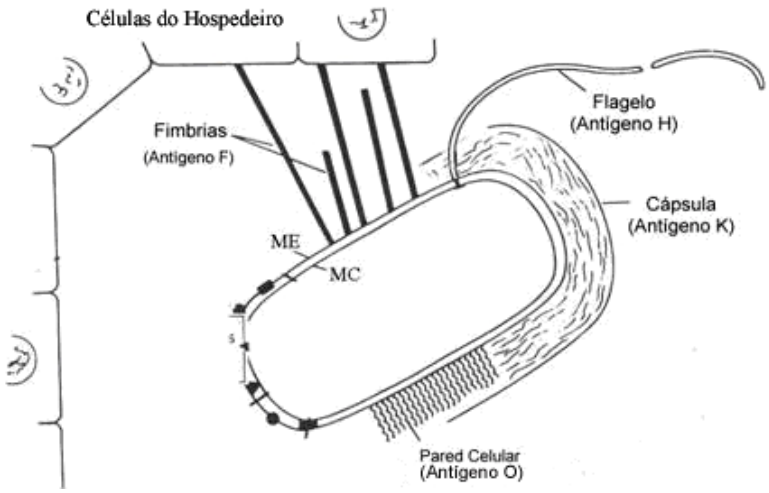

Figura 4 – Esquema de estruturas de superfície da bactéria *E. coli.* Adaptado de http://web.usc.es/~ecoli/E.coli2_archivos/image002.jpg

Desta forma, há a necessidade de detecção deste microrganismo tanto pela possibilidade da presença de cepas patogênicas, quanto pela indicação da presença de outras bactérias no ambiente analisado.

2.2.6. Métodos de detecção de coliformes

Os principais métodos de detecção bacteriana conhecidos podem ser divididos em dois grupos, os métodos convencionais, amplamente empregados, também conhecidos como padrão, e os métodos rápidos, mais recentes e que tentam encurtar o tempo de obtenção dos resultados. Dentre estes os principais métodos para detecção de coliformes, igualmente divididos nos grupos mencionados, são descritos abaixo.

2.2.7. Métodos Convencionais

A determinação de coliformes vem sendo realizada principalmente pela técnica dos tubos múltiplos, na qual se determina o Número Mais Provável (NMP) de células por grama ou mililitro do produto. Esta é realizada inoculando-se a amostra diluída em séries de três tubos para análise de alimentos, cinco para análise de água, crustáceos e moluscos, e dez para avaliação de água engarrafada ou amostras que não se espera que sejam altamente contaminadas (APHA, 2005). Tais tubos podem conter caldo lactose, caldo lauril sulfato triptose ou caldo lactose verde brilhante com 2% de bile, entre outros, com tubos de Durham invertidos em seu interior. As diluições são incubadas por 48 horas à 37°C sendo então analisadas quanto ao crescimento e à presença de gás no interior dos tubos de Durham, sendo tal resultado considerado como positivo para a presença de coliformes totais. Amostras dos tubos positivos são então repicadas para tubos com caldo EC (*Escherichia coli*) contendo tubos de Durham, e incubadas por 24 - 48 horas a 44 °C± 0,2 ^{o}C. De todos os tubos positivos faz-se uma semeadura em placa com meio seletivo agar azul de metileno – Levine com eosina e posterior identificação bioquímica. De acordo com o número de tubos que apresentam gás determina-se o NMP, pela consulta a uma Tabela desenvolvida por HOSKINS (1934, *apud* FRANCO, 2006).

Porém, este método apresenta uma série de inconvenientes, por ser trabalhoso, empregar grande quantidade de meio de cultura e vidrarias, exigir a manutenção em cultivo, além de necessitar de longo período de incubação, chegando a 96 horas para quantificação de coliformes totais e fecais (BRANCHER, 1992). Segundo SHARPE, PETERKIN & DUDAS (1979), é comum a obtenção de resultados falso-positivos em alimentos ricos em sacarose,

através da incorporação deste carboidrato ao meio de cultura e, conseqüentemente produção de gás por bactérias não fermentadoras de lactose. Podem ser obtidos também resultados falso-negativos pela presença de inibidores naturais ou artificiais nos alimentos. Outra desvantagem desse método é a obtenção de NMP, resultante de um cálculo estatístico cuja exatidão está relacionada com o número de tubos utilizados na análise (APHA, 2005).

Outra metodologia para detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* é o plaqueamento em meios seletivos, como o meio Agar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA), seguido de provas confirmativas.

A análise microbiológica da água pela técnica de membrana filtrante tem larga aceitação em função de sua praticidade, rapidez e precisão, sendo utilizada oficialmente em laboratórios do Brasil a partir de 1990 (BRASIL, 1990). Esta técnica baseia- se na filtração de um volume conhecido da amostra (ou diluições da mesma) através de uma membrana filtrante estéril com porosidade adequada (0,45 μm porosidade e 47 mm de diâmetro). A filtração é realizada com um aparelho que consta de um funil de filtração com tampa, suporte de membrana e frasco receptor. As bactérias a serem detectadas, apresentando dimensões maiores, ficarão retidas na superfície da membrana, a qual é então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial azul de metileno-eosina (EMB). Por capilaridades, o meio difunde-se para a membrana, havendo o desenvolvimento de colônias com características típicas, que poderão ser observadas e contadas.

A partir da contagem dessas colônias, calcula-se a densidade de coliformes presentes na amostra. Para a determinação de coliformes totais após a filtração da amostra a membrana filtrante é transferida para a superfície do meio M-Endo Agar LES ou Agar M- Endo, sendo efetuada a incubação a 35 ± 0,5ºC, durante 24 ± 2 horas. Após este período, efetua-se a contagem das colônias típicas de coliformes (com coloração rosa a vermelho escura e brilho verde metálico superficial). Se houver necessidade de confirmação das colônias, faz-se a transferência das mesmas para caldo lauril-triptose ou caldo lactosado, com posterior confirmação em caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%. Paralelamente à verificação das colônias, pode-se obter sua diferenciação para E. coli, utilizando-se o meio EC. Apesar de eficiente, tal técnica exige longo período de incubação para a confirmação de crescimento microbiano (MADIGAN, MAERTINKO & PARKER, 2004).

2.2.8. Métodos Rápidos

Os recentes avanços na tecnologia possibilitaram o desenvolvimento de técnicas que permitem detecções e identificações mais rápidas, sensíveis e específicas do que os testes convencionais. Alguns destes ensaios também foram automatizados. Os métodos enzimáticos, por exemplo, são amplamente utilizados, porém apresentam alto custo e até 24 horas de incubação para a detecção de contaminação.

Entre estes se destacam os meios líquidos e sólidos acrescidos do substrato 4-metil umbeliferil beta-D-galactopiranosídio (MUG), como por exemplo, o teste IDEXX Colilert®, baseado na capacidade de degradação do substrato cromogênico orto-nitrofenil galactopiranosídio (ONPG) e fluorogênico MUG, substratos análogos à lactose (glicopiranosídios). Os resultados são dados pela oxidação do ortonitrofenil a ortonitrofenol, gerando um produto de cor amarela quando o resultado é positivo para coliformes totais e um produto fluorescente quando bactérias *E. coli* estão presentes, lido sob luz UV, após 24 horas de incubação. Esta mudança de coloração ocorre devido à oxidação do 4-metil umbeliferil a 4-metil umbeliferona, pela enzima glucoronidase (KRAMER & LIU, 2002).

Apesar de tornarem o teste da água portátil, sem a necessidade de laboratório, métodos cromogênicos ou fluorogênicos ainda requerem no mínimo 24 horas para a liberação de resultados e são dispendiosos, além de haver a necessidade de emprego de incubadora. Desta forma, este é um método inviável quando se pensa nos países em desenvolvimento, onde em algumas regiões pessoas ingerem água, ainda que potencialmente contaminada, por ser esta a única fonte disponível (METCALF, 2010).

Métodos alternativos vêm sendo testados com o objetivo de diminuir o tempo de detecção de microrganismo e seus produtos, em água e alimentos, bem como de atenuar os custos. Entre eles o uso de biossensores vem se destacando, pois apresentam diversas vantagens.

2.3. Biossensores

2.3.1. Definição

Os biossensores envolvem uma área totalmente multidisciplinar, a elaboração desta nova tecnologia exige que estas diferentes áreas se conectem. De forma geral, os biossensores

podem ser definidos como dispositivos compactos de análise que incorporam um elemento de reconhecimento biológico (ácido nucléico, enzima, receptores, anticorpos, tecidos, células) ou biomimético (PIM-polímeros de impressão molecular, aptâmeros) associados a um sistema de transdução, que permite processar o sinal produzido pela interação entre o elemento de reconhecimento e a substância analisada (RUMAYOR *et al.*, 2005), conforme demosntrado na Figura 5. A aplicação de um biossensor permite a detecção quantitativa de um determinado alvo, pois este responde seletivamente e reversivelmente a um substrato químico, produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da espécie em questão (SILVA, 2009).

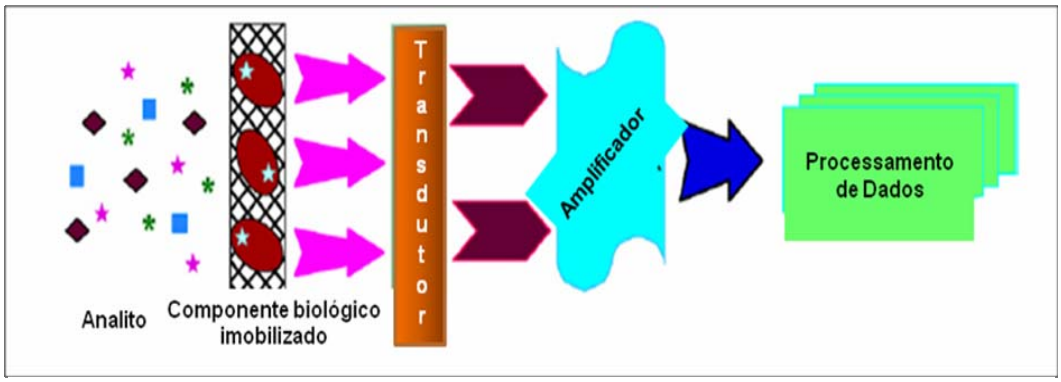

Figura 5 – Esquema geral de funcionamento de um biossensor (MELO, 2008).

A detecção é possibilitada pela interação do elemento de reconhecimento e o analito (substância a ser analisada), o que proporciona variações das propriedades físico-químicas (pH, transferência de elétrons, de calor, mudança de potencial, de massa, variação das propriedades ópticas, etc.), detectadas pelo transdutor. Este sistema transforma a resposta do elemento de reconhecimento em una sinal eletrônico, indicando a presença ou concentração do componente analisado (RUMAYOR *et al.*, 2005).

Os biossensores potenciaram o desenvolvimento de uma família de técnicas eletroquímicas que oferecem rapidez e simplicidade. Este gênero de detector permite realizar as mais variadas tarefas em diversas áreas e geralmente permite o uso de métodos com pouca produção de resíduos e de baixo custo, sem a necessidade de pré-tratamentos morosos e de grandes volumes de amostra. O seu uso, na maioria dos casos, não necessita de técnicos ou especialistas podendo dispensar o uso de reagentes, além de poderem ser fabricados tanto como aparelhos de uso contínuo quanto descartável. Assim, um biossensor deve ser

claramente diferenciado de um sistema bioanalítico que requer etapas adicionais de processamento, como adição de reagentes, e o componente biológico não está necessariamente ligado diretamente ao detector (PATACAS, 2007).

2.3.2. Breve Histórico dos Biossensores

O primeiro biossensor foi um analisador de glicose desenvolvido por Clark e Lyon, em 1962. Esse biossensor foi chamado de "eletrodo enzimático" e consistia de uma enzima glicose oxidase acoplada a um eletrodo de oxigênio. A enzima oxidava a glicose resultando em um declínio proporcional na concentração de oxigênio da amostra detectada pelo eletrodo (RUMAYOR *et al.*, 2005). Apesar disto, foram UPDIKE & HICKS (1966 *apud* PATACAS, 2007) que, extrapolando o conceito, resolveram os problemas de ordem prática, necessários para construir um elétrodo enzimático sensível à glicose.

O desenho de Clark foi tão bem sucedido que muitos biossensores experimentais e, pelo menos um biossensor comercial, ainda são construídos segundo o original. No entanto, hoje em dia, prefere-se, como alternativa, a medição de peróxido de hidrogênio. Destes destacam-se os biossensores produzidos pela companhia *Yellow Springs Instrument Company* (Ysi; Ohio, EUA) (PATACAS, 2007). O seu biossensor de glicose foi criado em 1975, baseado na detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio, foi o primeiro biossensor a ser produzido com fins comerciais (SILVA, 2009).

O termo biossensores entrou em uso a partir de 1977, quando se desenvolveu o primeiro dispositivo utilizando microrganismos vivos imobilizados na superfície de um eletrodo sensível à amônia. Este dispositivo foi usado para detectar o aminoácido arginina e seus criadores chamaram-no de "bio-sensor" seletivo. O termo foi simplificado para "biossensor" e tem-se mantido desde então para designar a união de um material biológico e um transdutor físico (RUMAYOR *et al.*, 2005). Durante os anos 80, foi pela primeira vez atingido o sucesso econômico em grande escala (PATACAS, 2007).

As atuais publicações científicas contêm descrições de uma larga variedade de dispositivos que exploram as enzimas, ácidos nucléicos, anticorpos, células intactas e receptores celulares (material biológico) em combinação com transdutores eletroquímicos, ópticos, calorimétricos e acústicos (sistema de transdução). As mudanças no material

biológico ou no sistema de transdução permitem milhares de estratégias alternativas de desenvolvimento de biossensores, cada uma apresentando novas soluções para problemas analíticos nas mais variadas áreas de atuação (RUMAYOR *et al.*, 2005).

2.3.3. Características dos Biossensores

Tais dispositivos apresentam características que permitem sua versatilidade e investimento em sua elaboração, as seguintes podem ser citadas:

- **Sensibilidade.** Algumas unidades são capazes de detectar quantidades abaixo dos limites prescritos pela lei, como no caso dos resíduos pesticidas;
- **Seletividade.** Interage com o composto de interesse e não com substância que tenham propriedades semelhantes. É alcançada por elementos de reconhecimento altamente específico;
- **Baixo custo de produção**. Em geral, estes sistemas podem ser fabricados em série, o que resulta em uma considerável redução dos custos de produção;
- **Operação simples**. A tecnologia normalmente não exige pessoal especializado;
- **Análises em curto prazo**. Esse recurso é especialmente interessante, permitindo que os resultados sejam obtidos em tempo real;
- **Possibilidade de automação**. Dispensar o controle manual dessas unidades facilita a integração em sistemas que controlam processos industriais;
- **Possibilidade de miniaturização**. Graças à evolução da microeletrônica e nanotecnologia estes dispositivos apresentam dimensão reduzida. Aplicáveis aos ensaios em que o tamanho físico do dispositivo, o volume de amostra ou a localização da medida são fatores limitantes;
- **Estabilidade operacional**. A resposta do biossensor pode variar em função de diversos fatores como: geometria do sensor, método de preparo, assim como, receptores e transdutores usados. Depende da difusão externa e interna do substrato, e das condições operacionais de trabalho (concentração do analito, temperatura, pH, natureza do tampão, presença de solventes orgânicos e de outras substâncias e composição da solução matriz que contém a amostra).

Portanto, os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas analíticas existentes, devido as suas características únicas (ROSATTO *et al*., 2001).

2.3.4. Classificação dos Biossensores

O elemento de reconhecimento e o sistema de transdução, que constituem determinado biossensor, variam conforme a destinação de utilização do mesmo. Os biossensores podem ser classificados em função: do tipo de interação estabelecida entre o elemento de reconhecimento e o analito; do método utilizado para detectar tal interação; da natureza do elemento de reconhecimento; e do sistema de transdução empregado, conforme indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Critérios de classificação dos biossensores.

Tipos de Interação	**Detecção de Interação**
Biocatalítica	Direta
Bioafinidade	Indireta
Elementos de Reconhecimento	**Sistemas de Transdução**
Enzimas	Eletroquímico
Orgânulos, células completas, tecidos	Óptico
Receptores biológicos	Piezoelétrico
Anticorpos	Termométrico
Ácidos nucléicos	Nanomecânico
PIM, aptâmeros	

Adaptado de RUMAYOR *et al*, 2005

2.3.5. Tecnologia dos Biossensores

2.3.6. Tipos de Interação

Em geral, dependendo das propriedades de reconhecimento dos vários componentes biológicos os biossensores podem ser divididos em duas categorias: biossensores biocatalíticos e biossensores de bioafinidade (MARAZUELA & BONDI, 2002).

2.3.7. Biossensores Biocatalíticos

Baseados no uso de biocatalisadores, elementos que favorecem a ocorrência de reações químicas a partir de um ou mais substratos, havendo a formação de um ou mais produtos, sem o consumo do biocatalisador, que pode ser regenerado e reutilizado. Estes biocatalisadores podem ser sistemas que tem como elementos de reconhecimento enzimas, organelas celulares, células inteiras ou tecidos animais ou plantas. Estes elementos podem estar conectados a diferentes tipos de transdutores, eletroquímico, óptico, termométrico e acústico (MARAZUELA & BONDI, 2002)

Podem ser usados para detectar a presença de um dos substratos envolvidos na reação, através da observação do desaparecimento de um co-substrato conhecido, diferente daquele a ser detectado, ou o aparecimento de um produto. Existem substâncias tóxicas, tais como inseticidas e herbicidas que inibem a atividade de certos sistemas de enzimas de forma seletiva, de modo que estes sistemas podem ser utilizados para detectar sua presença (RUMAYOR *et al.*, 2005).

2.3.8. Biossensores de Bioafinidade

Estes sensores baseiam-se na interação do analito de interesse com o elemento de reconhecimento, sem conversão catalítica, mas sim com a produção de um complexo destes dois componentes (MARAZUELA & BONDI, 2002).

Para medir a interação, já que não há consumo de substrato ou geração de produtos, geralmente usa-se um elemento de reconhecimento marcado ou alguma substância que possa competir com o analito por ligação no receptor. Pode-se também utilizar um sistema de detecção direta da interação entre o elemento e o analito com base nas alterações que ocorrem

na massa da superfície ou por mudanças nas propriedades da luz que ocorrem como resultado desta união. Este tipo de interação pode levar a saturação do receptor e muitas vezes não permitem o monitoramento contínuo do processo de detecção. O elemento de reconhecimento deve estar em contato direto com a amostra e não pode incorporar uma membrana externa para separar o elemento sensível da amostra, de modo que alguns desses biossensores têm dificuldade em operar em matrizes biológicas complexas. Eles podem ser usados para detectar material genético de microrganismos, para detectar a presença de patógenos ou pesticidas ou qualquer tipo de substâncias que possa causar uma resposta imune (e, portanto, permitir o desenvolvimento de anticorpos). Existem diferentes tipos de elementos de reconhecimento passíveis de serem utilizados, tais como, lectinas, receptores, células inteiras, ácidos nucléicos, PIMs, aptâmeros e anticorpos, sendo que a utilização deste último leva à produção de imunossensores (RUMAYOR *et al*, 2005). O presente trabalho se insere nesta categoria, quando a classificação se baseia no elemento de reconhecimento ou material biológico, visto que utiliza anticorpos, para detecção de bactérias, como biocomponente.

2.3.9. Imunossensores

Caracterizam-se por apresentarem anticorpos como elemento biológico de reconhecimento, responsável pala especificidade do biossensor (ANDERSON *et al,* 1997). Os anticorpos (Ac) são moléculas de glicoproteína produzidas pelos linfócitos B em resposta a presença de um imunógeno (substância estranha ao organismo); com alta especificidade e afinidade ligam-se à substâncias particulares (antígenos, Ag). São constituídos basicamente de dois sítios, chamados de porção variável (Fab), responsável pela ligação aos antígenos, e porção cristalizável (Fc), responsável pela variação de classe nos anticorpos (IgG, IgA, por exemplo), Figura 6 (AMABIS & MARTHO, 2004).

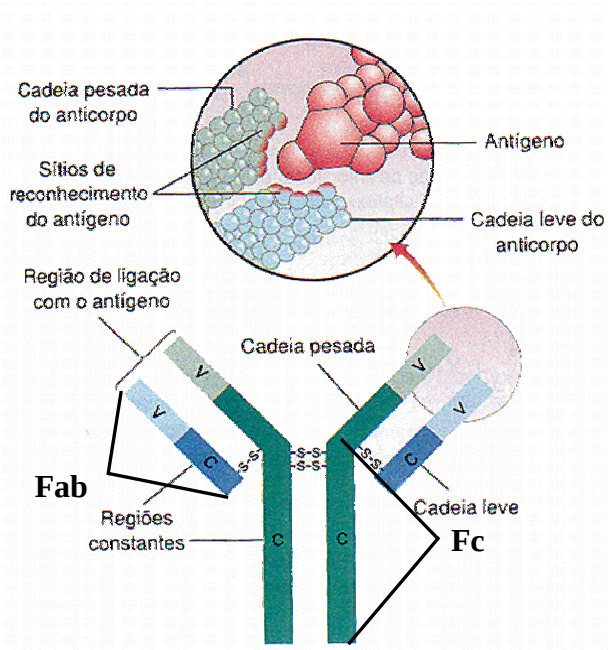

FIGURA 6 – Esquema da estrutura básica da do anticorpo IgG, no detalhe é mostrada.a região de ligação com o antígeno. Adaptado de AMABIS & MARTHO, 2004.

Os sítios da porção cristalizável são específicos para algumas proteínas, como, por exemplo, para a proteína A, originada da parede da bactéria *Sthapylococcus aureus* (ANDERSON *et al,* 1997). O correto funcionamento dos biossensores depende essencialmente da correta imobilização dos ligantes à superfície dos sensores, sua correta orientação e homogeneidade (HOCK, SEIFERT & KRAMER, 2002). Assim a ligação da proteína A ao biossensor, permite a ligação correta dos anticorpos, com a porção variável exposta, conforme ilustrado na Figura 7, e consequentemente aumenta a eficiência da captura dos antígenos (ANDERSON *et al,* 1997; SERIZAWA, 2007).

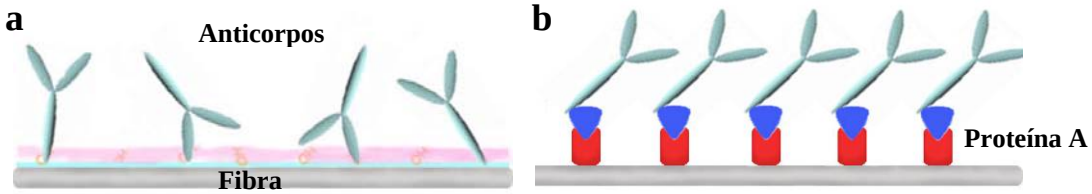

FIGURA 7 – Ligação dos anticorpos IgG à superfície da fibra. a – Anticorpos ligados à fibra sem proteína A. b – Anticorpos ligados corretamente à fibra devido À utilização de proteína A.

A maior parte dos imunossensores desenvolvidos é usada nas áreas clínica e médica, visando rápidas determinações de células tumorais, microrganismos patogênicos, toxinas e substâncias no sangue (SILVA, 2009), suas vantagens e desvantagens são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Principais vantagens e desvantagens dos anticorpos aplicados aos imunossensores.

ANTICORPOS	
Vantagens	**Desvantagens**
Elevada sensibilidade e especificidade	Não existe consumo do analito (faixa estreita de operação)
Estabilidade química	Requer contato direto com a amostra
Afinidade variável	Não permite detectar substâncias desconhecidas
Resposta rápida	Pode necessitar de marcação
Baixo custo	Não amplifica o sinal
	Difícil regeneração

Adaptado de RUMAYOR *et al* (2005).

A reutilização deste tipo de biossensor é dificultada pela possibilidade de degradação das estruturas dos anticorpos (RUMAYOR *et al*, 2005). Na prática, para atingir uma sensibilidade adequada é necessário que o complexo (anticorpo – analito) tenha alta afinidade, sendo difícil sua dissociação, por isso os sistemas são muitas vezes de uso único. No entanto, o anticorpo pode ser regenerado por dissociação do complexo através de alterações das condições do meio que favoreçam a separação, embora estas condições, muitas vezes causem danos na estrutura do anticorpo (KANDIMALLA, *et al*, 2004; WIJESURIYA *et al*, 1994). Finalmente, outra necessidade que este tipo de biossensor apresenta é a de minimizar ligações inespecíficas, para garantir especificidade de detecção do analito (RUMAYOR *et al*, 2005).

2.3.10. Técnicas de Imobilização

Uma etapa fundamental para a construção de um biossensor é a imobilização do elemento de reconhecimento à superfície do transdutor. Entre as técnicas mais comuns utilizadas estão a adsorção física, a ligação cruzada (cross-linking) e a formação de ligações covalentes, estas ligações podem ocorrer diretamente sobre o transdutor ou de forma indireta, sobre uma camada intermediária, como por exemplo, a proteína A (TAITT, ANDERSON & LIGLER, 2005). A técnica de imobilização escolhida deve possibilitar uma ligação estável entre a superfície a ser sensibilizada e o elemento de reconhecimento, sem interferir na atividade biológica do sistema (TEDESCHI *et al*, 2003). Além disso, a escolha de um ou outro processo depende da natureza do elemento biológico, do tipo de transdutor, das propriedades físico-químicas da substância e das condições de trabalho do biossensor (RUMAYOR *et al*, 2005). As fibras ópticas plásticas, por exemplo, permitem a formação de grupamentos amino em sua superfície através do tratamento com hexametilenodiamino, estes grupamentos permitem a ligação de substâncias como o glutaraldeído, responsável pela formação de uma ponte de ligação covalente com substâncias como a proteína A citada (FIXE *et al.,*2004; ANDERSON *et al.,* 1997).

2.3.11. Sistemas de Transdução

De uma forma genérica, define-se transdutor como sendo todo dispositivo que transforma uma forma de energia em outra. No âmbito da instrumentação elétrica, define-se transdutor como sendo todo equipamento que converte qualquer grandeza física não elétrica (temperatura, som, luz, como exemplos) em um sinal elétrico (GIL & APODACA, 2002). Sob o ponto de vista da confecção de um biossensor, transdutor é o equipamento que converte o produto da reação biológica em um sinal elétrico mensurável e processável. O papel deste equipamento consiste em detectar a presença, a mudança, a amplitude ou a freqüência de uma grandeza submetida à medição e prover na saída um sinal elétrico que, quando convenientemente processado e aplicado a um aparelho de medição, permita quantificar o elemento medido (SILVA, 2009).

A combinação das mais variadas áreas, como eletroquímica, física, eletrônica, tecnologia de sistemas integrados de silício e de fibras ópticas no desenvolvimento de novos transdutores, aliada à bioquímica e imunoquímica, tem tornado possível o surgimento de micro-biossensores altamente sensíveis, específicos, seletivos e acurados (SILVA, 2009).

A escolha do transdutor é realizada mediante três requisitos básicos: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado; que seja altamente específico para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada (RUMAYOR *et al*, 2005). Outros aspectos também devem ser atendidos, como: freqüência da resposta; compatibilidade com o meio ambiente onde tem que operar; exatidão; características elétricas (relação entre sinal e ruído; possibilidade de amplificação do sinal quando insuficiente; limitações da freqüência de resposta) e condições de aplicação e robustez (peso, dimensões, robustez mecânica e elétrica) (SILVA, 2009).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o seu sistema de transdução. Dentre os vários transdutores empregados na construção dos biossensores, os mais utilizados são os eletroquímicos, ópticos e calorimétricos (MARAZUELA & BONDI, 2002). Na Tabela 5, encontram-se os vários sistemas de transdução, seus modos de medição e aplicação típica.

Tabela 5: Tipos de transdutores empregados em biossensores.

Sistemas de Transdução	Modo de medida	Aplicações típicas
Eletroquímicos		
Condutimétrico	Condutância	Reações catalisadas por enzimas
Amperométrico	Corrente	Substratos enzimáticos e sistemas imunológicos (antígeno/anticorpo)
Potenciométrico: FET (Transistores de Efeito de Campo) ISE (Eletrodo Íons Seletivos)	Voltagem	Íons, gases, substratos enzimáticos e analitos imunológicos Íons em meio biológico, eletrodos enzimáticos e imunoeletrodos
Impedimétrico	Impedância	Imunossensores enzimáticos
Acústicos		
Cristais piezoelétricos, equipamentos de superfície acústica	Variação de massa	Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos
Ópticos		
Optoeletrônicos, fibras óticas, equipamento de ondas guiadas	Variação de luminosidade (luminescência, fluorescência), Índice de refração	pH, substratos enzimáticos, analitos imunológicos
Calorimétricos		
Termistores, diodos	Calor	Enzima, organela, células integras ou tecidos, gases, poluentes, antibióticos, vitaminas, analitos imunológicos

Adaptado de: MASCINI *et al* .(2001) *apud* SILVA (2009).

Os sinais produzidos pelos transdutores muitas vezes não podem ser diretamente interpretados e necessitam de um software para seu processamento (RUMAYOR *et al*, 2005).

2.3.12. Transdutor Óptico

Transdutores ópticos são baseados na medição das mudanças que ocorrem nas propriedades da luz como um resultado da interação física ou química entre analito a detectar e o elemento de reconhecimento biológico do biossensor. As bases físicas deste tipo de sensor são as mudanças que ocorrem na absorção, fluorescência, luminescência, dispersão ou índice de refração quando a luz é refletida na superfície de reconhecimento, detectadas pelo transdutor. O sistema básico consiste em uma fonte de luz, um meio de propagação (por exemplo, o ar ou uma fibra óptica), um elemento sensor (onde as moléculas do elemento de reconhecimento se encontram) e um detector. Podem ser usados em métodos diretos, sem a necessidade de marcação e indireto, na qual utiliza-se marcação do elemento sensor. Tais transdutores podem ser conectados a elementos de reconhecimento biocatalíticos ou de bioafinidade. Os transdutores ópticos variam muito em função de suas propriedades e incluem sensores de fibra óptica (guia de onda), sensores de ressonância de plasma e sensores de ondas evanescentes (RUMAYOR *et al*, 2005).

2.3.13. Sensor de fibra óptica

Estes dispositivos podem ser caracterizados pelo emprego da fibra óptica como base para o elemento de reconhecimento biológico (MONK & WALT, 2004). As fibras ópticas, ou guias de onda, são estruturas projetadas para guiar luz de um ponto ao outro por um caminho não necessariamente reto (WERNECK, 1996).

Para aplicação em pequenas distâncias (<100 m), sensores baseados em fibra óptica plástica (POF) oferecem vantagens consideráveis em relação às fibras de sílica, incluindo baixo custo, facilidade de manuseio, menor temperatura necessária para modificações (MARAZUELA & BONDI, 2002) e uma maior resistência a fraturas. POF tornou-se uma alternativa viável devido aos avanços em materiais e fabricação, havendo aumento da largura de banda e redução de perdas ao longo da fibra, aumentando sua credibilidade em áreas como telecomunicação e sensoriamento (RUMAYOR *et al*, 2005; SERIZAWA, 2007).

As POF disponíveis comercialmente geralmente tem 1 mm de diâmetro, são multi-modo (diferentes feixes luminosos são transmitidos em seu interior) e podem ser feitas de diferentes materiais, sendo o metacrilato de polimetila (PMMA), cuja subunidade molecular é mostrada na Figura 8, um dos mais convencionais polímeros ópticos utilizados por causa de sua resistência mecânica, boa estabilidade e resistência à mudanças do meio (YANG, 2008). A superfície das fibras de PMMA apresenta um ambiente hidrofóbico e favorável a reações químicas e ligação de proteínas (FIXE, 2004; LI, HU & LIU, 2004; ATIAS *et al.*, 2009). Tais fibras podem ter o núcleo composto de PMMA puro (índice de refração 1,492) e a casca de PMMA fluoretado (índice de refração 1,405), com pico de transmissão na janela do espectro do visível (500–650 nm) (WONG *et al.*, 2003).

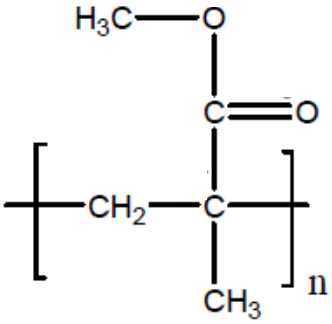

Figura 8. Subunidade molecular do metacrilato de polimetila (PMMA). Adaptado de LYE *et al.* , 2005.

As fibras ópticas transmitem luz com base no princípio de reflexão interna total (TIR) na interface entre o núcleo e a casca. Quando esse fenômeno ocorre os raios de luz são guiados através do núcleo da fibra com pouca perda para a casca e consequentemente para o meio. A fibra óptica é formada por um núcleo com um índice de refração n_1 e um revestimento ou casca com um índice de refração n_2. Para que a propagação por TIR ocorra é necessário que o índice de refração do núcleo (n_1 ou n_{co}) seja maior do que o do revestimento (n_2 ou n_{cl}), ou seja, $n_1 > n_2$. Quando um raio de luz atinge a interface entre a fronteira destes meios de índices de refração diferentes o ângulo de incidência (θ) é maior que o ângulo crítico (θc), definido pela lei de Snell (θc = sin-1 [n_2/n_1]), ele será assim totalmente refletido internamente e ocorrerá a propagação através da fibra (WEI *et al.,* 2007), vide Figura 9.

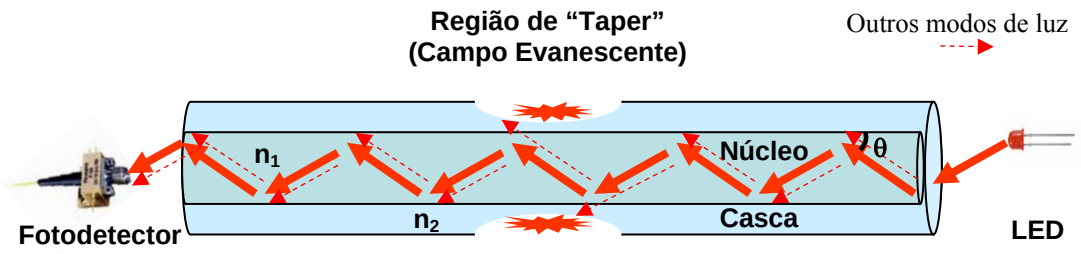

FIGURA 9 – Fenômeno da Reflexão Interna Total. Feixes de luz emitidos por uma fonte são transmitidos através da fibra óptica e detectados por um fotodetector. Há perda de luz na região do campo evanescente.

Quando a luz incidente é totalmente refletida, sua intensidade não decai abruptamente para zero na interface núcleo-casca. Uma pequena parte da luz deixa o núcleo e penetra na casca ao sofrer refração, distanciando-se o suficiente para haver o reconhecimento do índice de refração do meio externo à casca. Este campo eletromagnético, chamado de campo evanescente, tem uma intensidade que decai exponencialmente com a distância a partir da interface e estende-se ao meio de menor índice de refração (VELASCO-GARCIA, 2009). A profundidade de penetração (DP, equação 1), definida como a distância necessária para a amplitude do campo elétrico decair para 1/e (0,37) do seu valor na interface, aumenta com a aproximação dos índices da casca e do meio e é também função do comprimento de onda da luz e do ângulo de incidência (MARAZUELA & BONDI *et al.*, 2002).

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_{co}^2 \sin^2\theta - n_{cl}^2}} \qquad \textbf{Equação 1}$$

Onde λ é o comprimento de onda da luz transmitida, θ é o ângulo de incidência na interface núcleo/casca e n_{co}, n_{cl} são, respectivamente, os índices de refração (RI) do núcleo e da casca (MARALDO, SHANKAR & MUTHARASAN, 2006).

O campo evanescente pode interagir com moléculas alcançadas pela profundidade de penetração, produzindo um fluxo líquido de energia em toda a superfície refletora no entorno, (i.e, com índice de refração n_2) mantendo o campo evanescente. Esta transferência de energia levará à atenuação da reflexão, podendo ser usada para o desenvolvimento de sensores baseados em campos evanescentes (MARAZUELA & BONDI, 2002). Desta forma, qualquer

interação molecular que ocorre neste campo (como a união de uma substância a um anticorpo imobilizado na superfície da fibra) produz alterações nas características da luz que viaja através da fibra óptica e pode ser medida e relacionada com a concentração do analito (RUMAYOR *et al*, 2005).

2.3.14. Formas de Exposição do Campo Evanescente

Um aumento da sensibilidade do conjunto pode ser desejável e até necessário dependendo do analito. Este pode ser conseguido com a ampliação do campo evanescente que poderá ocorrer de diferentes formas dependendo do material da fibra óptica. Fibras plásticas podem ter sua casca removida quimicamente (WONG, 2003 [a, b]; FIXE, 2004) ou a casca pode ser removida, ou apenas diminuída, fisicamente. Neste caso, o diâmetro da fibra diminui e o campo evanescente pode interagir com o ambiente ao redor de forma mais intensa na região afilada, comumente chamada de "taper" (LYE, *et al,* 2005*;* VELASCO-GARCIA, 2009).

O afilamento de natureza física normalmente se dá pela utilização de uma chama e o tracionamento da fibra para ambos os lados, conforme indicado na Figura 10, ou utilizando-se máquinas adaptadas ou desenvolvidas para este fim. A baixa repetibilidade na fabricação de fibras ainda é um entrave, estudos demonstram que a variação de determinados parâmetros, como o diâmetro e largura do "taper", podem influenciar na sensibilidade do biossensor (LEUNG *et al*, 2006).

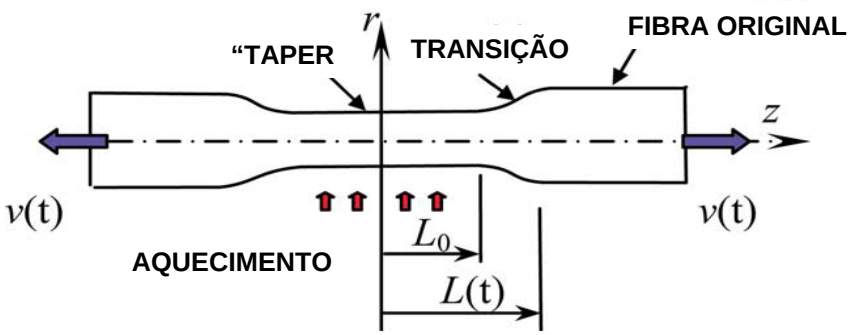

Figura 10. Representação esquemática do processo de estiramento da fibra óptica. Adaptado de XUE *et al.*

L_0 é a metade inicial de comprimento da região aquecida, enquanto L (t) é a metade do comprimento da fibra afilada no momento t. No sistema de coordenadas cilíndricas (r, z) mostrada na Figura 10, a fibra a ser reduzida é colocada horizontalmente, com a origem no centro do plano médio, onde a velocidade axial é 0 (em razão da simetria).

2.3.15. Influência da geometria na sensibilidade e estabilidade dos sensores

A detecção de determinados analitos requer alta sensibilidade dos biossensores, além de estabilidade, estes fatores parecem estar intimamente relacionados à geometria da fibra utilizada no desenvolvimento do sensor (LEUNG *et al*, 2006). A transição da parte não afilada para o "taper" da fibra, por exemplo, deve ser gradual e o mais curta possível, segundo XUE *et al.*, para maior eficiência do sensor. Variações, ainda que sutis, de alguns parâmetros como o diâmetro, podem inclusive modificar a curva de transmissão de negativa para positiva quando a fibra é posta em meios com diferentes índices de refração (do ar para água, por exemplo) ou quando é colocada em contato com suspensões bacterianas (LEUNG *et al*, 2006). Alguns trabalhos abordam um aumento da sensibilidade não apenas com o afilamento das fibras, mas também com sua curvatura (HALE & PAYNE, 1996; KHIJWANIA & GUPTA, 2000), este modelo também apresenta como vantagens uma manipulação mais fácil, uma maior compactação e melhor resistência mecânica (FERREIRA, WERNECK & RIBEIRO, 2001; FRAZÃO *et al*.,2008). Para uma maior eficiência na utilização dos sensores ópticos os processos de determinação e otimização de parâmetros das fibras são essenciais, modelos matemáticos também podem contribuir pra a adequação das fibras (BUCHADE & SHALIGRAM, 2007).

2.3.16. Aplicações dos Biossensores

A versatilidade de montagem dos biossensores, assim como de detecção de diferentes substâncias, aliadas a sua capacidade em determinar de forma seletiva analitos em amostras complexas, apresentarem rapidez de análise, diminuir custo e resíduos (LEUNG *et al,*2006), tem atraído o interesse de diferentes áreas.

Desde o surgimento dos primeiros biossensores, foram desenvolvidos sensores que atendem a diversas áreas como: análises clínicas, militar, controle de processos, indústrias de

alimentos e monitoramento ambiental (MARAZUELA & BONDI, 2002), (Tabela 6). Dentre estas, a área que mais vem se desenvolvendo na criação e também na comercialização destes instrumentos é a área médica.

Tabela 6 - Mercado potencial de aplicação dos biossensores.

Áreas de Atuação	Aplicações
Clínica/Médica	Testes de medicamentos; bancos de sangue, equipamento médico; monitoração terapêutica de medicamentos; monitoração cirúrgica e pós-operatória; detecção de anticorpos; diagnóstico clínico e auto análise; detecção de células tumorais e de agentes patogênicos; controle de órgãos artificiais (NATH, JAIN & ANAND, 1997; BOJORGE-RAMÍREZ, SALGADO & VALDMAN, 2007)
Industrial	Fermentação, processamento de medicamentos e alimentos, controle de qualidade; detecção de contaminantes; monitoração de águas e resíduos tóxicos; análise de cosméticos (RUMAYOR. *et al*, 2005; MELLO & KUBOTA, 2002).
Agricultura/Veterinária	Diagnósticos de doenças em plantas ou animais; monitoração da química da agricultura; detecção de produtos químicos tóxicos; análises do solo e da água; medida da demanda biológica de oxigênio (DBO); controle de qualidade da carne e produtos vegetais; monitoração de transporte e armazenamento (TSCHMELAK, PROLL & GAUGLITZ, 2004).
Segurança/Defesa	Detecção e diagnóstico de agentes químicos e biológicos perigosos incluindo explosivos, micotoxinas, vírus, bactérias patogênicas e toxinas biológicas (INAMI *et al*, 2009; RIJAL *et al*, 2005).
Meio Ambiente	Detecção de produtos tóxicos no ar, na água e no solo; detecção de espécies contaminantes e medida da demanda biológica de oxigênio (DBO). (VELASCO-GARCIA & MOTTRAM, 2003)
Nanotecnologia	Desenvolvimento de tecnologias para a avaliação de células vivas, monitoramento do início da apoptose pela via mitocondrial em células vivas - detecção de atividades enzimáticas das Caspases (KASALI, SONG & VO-DINH, 2004; VO-DINH, 2008)

Algumas desvantagens, porém ainda são atribuídas aos biossensores, como a pouca reprodutibilidade e estabilidade dos resultados, muitas vezes relacionadas à grande variação geométrica entre as fibras, a variações no sistema de leitura utilizado ou até mesmo ao acoplamento das fibras a estes sistemas. A maior parte dos biossensores não pode ser esterilizada devido à alta sensibilidade do componente biológico; funcionam em uma faixa

limitada de concentração e re-calibrações e substituição dos componentes biológicos podem ser necessárias, sendo hoje pouco usados nas indústrias para monitoramento *on-line* de substratos e produtos (SILVA, 2009). A necessidade de alta sensibilidade para determinados analitos também é um entrave, levando a busca de formas de amplificação do sinal fornecido pelo transdutor. Tais fatores levam a falta de credibilidade dos biossensores para a aplicação em algumas áreas, contribuindo para a escassez dos biossensores no mercado

2.3.17. Mercado dos Biossensores

A área de diagnóstico, como um todo, representa um grande mercado, bem implementado e em contínua expansão, como pode ser observado no gráfico da Figura 11. Neste mercado, encontra-se uma das maiores razões de sucesso e a maior área de aplicação dos biossensores.

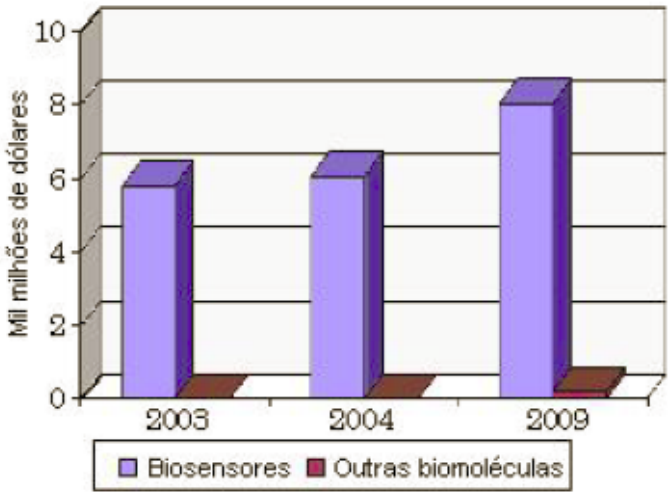

Figura 11: Valores para o mercado de biossensores e bioeletrônicos até 2009 (BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY *apud* PATACAS, 2007).

Segundo estudos, o mercado global de biossensores e outros produtos bioeletrônicos cresceu de 6,1 milhões de dólares em 2004 para 8,2 milhões de dólares em 2009, tendo um crescimento anual médio da ordem dos 6,3%. Os biossensores de glicose constituíram a quase totalidade das vendas em 2003, sendo que as aplicações às ciências biomédicas e da vida dominam o mercado, com 99%, deixando a monitoração ambiental num distante segundo lugar (PATACAS, 2007). O desenvolvimento de nano biossensores, aliando os avanços em

nanotecnologia e sensoriamento, apresenta-se como uma alternativa para uma maior aplicação destes dispositivos e encontra-se em expansão, como pode ser observado no gráfico da Figura 12.

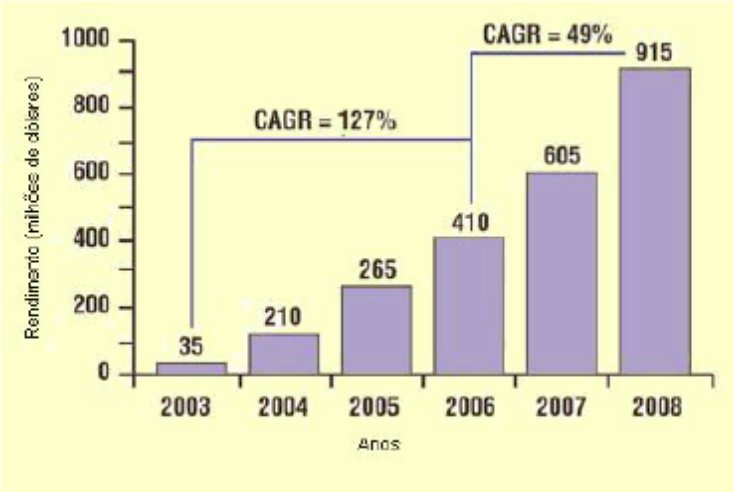

Figura 12: **Expansão do mercado para nano biossensores.** Avaliada como um crescimento composto anual (CAGR) de 92% até 2008 apenas com as aplicações devidas à aplicação da nanotecnologia ao diagnóstico médico (FRONT LINE STRATEGIC CONSULTING INC., San Mateo, CA, 2003 *apud* PATACAS, 2007).

Apesar de algum sucesso comercial, a comercialização dos biossensores para as diferentes áreas é muito pequena em comparação com o número de estudos sobre o tema (SMITH, 2005). A fabricação de um sensor para a área médica pode levar até cinco anos e custar $40 milhões de dólares, levando a maior parte dos pesquisadores e desenvolvedores a desistir do produto antes que este atinja a comercialização. Uma estratégia possível para essas empresas é desviar alguns ou todos os seus recursos para o desenvolvimento de biossensores para os mercados industriais ou ambientais, que apresenta menores barreiras regulamentares no ambiente industrial e aplicações de sensoriamento, quando comparados com o mercado médico (SMITH, 2005).

Como prospecção futura de aplicação dos biossensores, pode-se dizer que o crescente desenvolvimento da nanotecnologia, promovendo um aumento dos nanobiossensores, vem ampliar e muito o campo de aplicação e uso destes instrumentos. Além disso, o aprimoramento dos sistemas de leitura, o desenvolvimento de máquinas que permitam maior reprodução na elaboração das fibras, levando ao aperfeiçoamento dos biossensores existentes, bem como as necessidades do mercado, possibilitam o vislumbramento de avanços na área dos biossensores.

Desta forma, dado o exposto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e avaliação de um imunossensor óptico, utilizando fibra óptica plástica, para a detecção da bactéria *Escherichia coli* em água.

3: OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver um imunossensor capaz de detectar especificamente *Escherichia coli* na água, em menos de 60 minutos, utilizando fibra óptica plástica de metacrilato de polimetila como base para a construção do mesmo.

3.2. Objetivos Específicos

a) Adquirir e avaliar a fibra óptica plástica a ser utilizada no sensor; produzir as regiões sensíveis, através de estiramento, e padronizar suas dimensões de modo a torná-la adequada como suporte para a montagem do imunossensor.

b) Produzir e determinar a conformação do taper com maior sensibilidade a variações ambientais.

c) Ligar os anticorpos anti-*E. coli* de forma funcional à superfície da fibra.

d) Ligar especificamente a bactéria *E. coli* à fibra recoberta com anticorpos.

e) Detectar a atenuação do sinal luminoso na fibra causado pela ligação da bactéria *E. coli* à fibra.

f) Avaliar a influência da modificação de fatores ambientais, como temperatura, pH e dureza, nas leituras promovidas pelo imunossensor.

4: MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fibra óptica

Para a produção do sensor foi obtida comercialmente a fibra óptica plástica – POF (Mitsubishi Eska GH4001) com núcleo de metacrilato de polimetila (PMMA) e com superfície de PMMA fluoretado, com diâmetro total de 1000 µm.

4.2. Produção da região sensível da fibra

As regiões sensíveis ou "tapers" das fibras foram produzidas através de estiramento utilizando-se tração e calor. Este estiramento possibilitou maior interação dos feixes luminosos com o meio externo à casca.

4.2.1. Equipamento e procedimento de estiramento

O equipamento utilizado para o estiramento das fibras foi construído especialmente para o projeto e é constituído de um sistema de aquecimento e tração (Figura 13a) controlado por computador através do programa LabVIEW®. O procedimento foi iniciado com a inserção da fibra na resistência para aquecimento (Figura 13b), e assim que a temperatura ideal foi atingida (aproximadamente 90º C), os motores fizeram o estiramento gradual. Após o estiramento, um ventilador foi ligado, para um rápido resfriamento, e a região da fibra cortada nas extremidades em tamanho ideal para a realização dos experimentos.

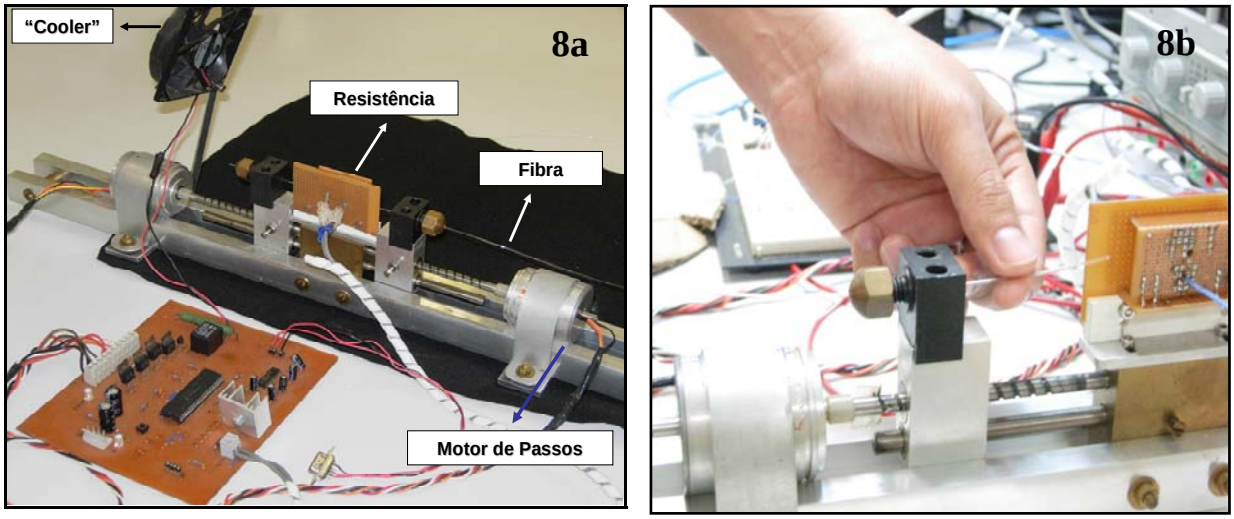

Figura 13. Estiramento da fibra óptica. a- Máquina de estiramento e circuito eletrônico desenvolvido para controle do processo de estiramento. b- Inserção da fibra, através dos conectores e pela resistência, com posterior aquecimento e afilamento por acionamento dos motores de passos.

O sistema geral de estiramento é apresentado em um diagrama de blocos na Figura 14. O circuito integrado PIC16F877A controla a operação de todo o processo; o sistema de aquecimento, o "cooler" e os motores de passo são ativados pelo microcontrolador. O software do microcontrolador foi desenvolvido através de linguagem de programação C.

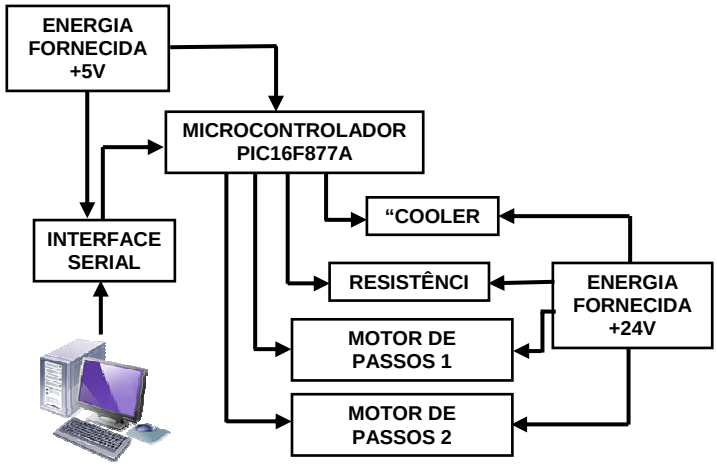

Figura 14. Diagrama de blocos de operação da máquina de estiramento.

4.2.2. Fabricação das fibras em formato de U

Após o processo de estiramento, algumas fibras foram manualmente curvadas utilizando-se um ferro de solda. Para se obter um melhor acoplamento ao sistema, ou seja, injeção de luz na fibra ou transmissão da luz da fibra para um fotodetector, tanto as fibras apenas estiradas quanto as dobradas foram clivadas manualmente com lâminas de corte e suas extremidade foram polidas com lixas d'água.

4.3. Determinação da melhor conformação de fibra a ser utilizada

Com o objetivo de eleição do grupo de fibras cuja conformação (apenas estirada ou dobrada) possibilitasse maior sensibilidade às variações do meio externo à casca avaliou-se as dimensões dos "tapers" das fibras estiradas.

4.3.1. Caracterização das dimensões das fibras

As dimensões geométricas das fibras foram caracterizadas a partir de fotos dos "tapers" obtidas com o uso de uma câmera fotográfica (Coolpix 4500, Nikon-Japan) acoplada a um estereoscópio (NIKON SMZ645). O objetivo foi determinar qual grupo de fibras (apenas estiradas ou estiradas e dobradas) seria o mais indicado para a elaboração do sensor. Desta forma, parâmetros como o diâmetro (d) e o comprimento dos "tapers" (c), assim como o diâmetro de suas extremidades (a e b), que podem ser observados através da Figura 15, foram investigados; essas medidas foram obtidas através do "software" ImageProPlus® após calibração feita de acordo com uma escala milimétrica escolhida.

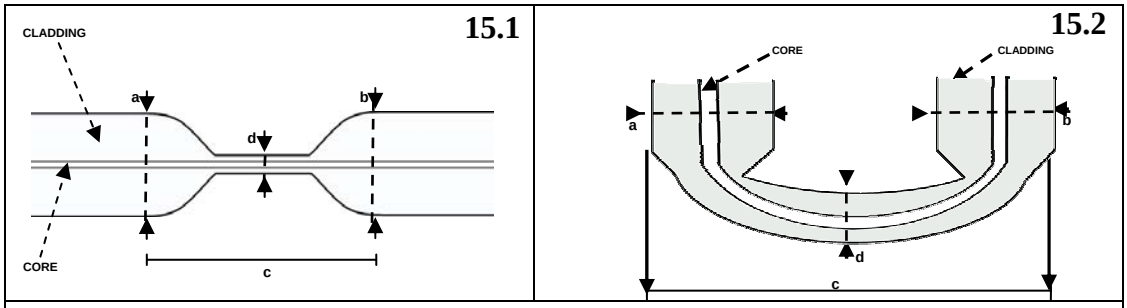

Figura 15. **Ilustrações referentes às fibras após estiramento e dobra**. **15.1-**fibra estirada. **15.2-**fibra estiramento e dobrada. Parâmetros utilizados para caracterização das fibras: **a** e **b** – laterais das fibras; **c** – comprimento do "taper"; **d** – diâmetro do "taper".

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura

Imagens das superfícies das fibras, após estiramento e também após dobra, foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV JEOL, modelo-6460LV). O preparo das amostras foi feito por fixação do material com fita de carbono ou com cola de prata e posterior metalização com ouro. A aquisição destas imagens teve como objetivo determinar se o processo de aquecimento, estiramento ou de dobra ocasionava alguma modificação na superfície das fibras. Assim, um controle negativo com fibra sem nenhum tipo de tratamento, foi utilizado para efeito de comparação.

4.3.3. Sistema de medição

O sistema óptico-eletrônico empregado para a análise das fibras é representado na Figura 16. O sistema consistiu em um LED ("light emitting diode"), operando em um

comprimento de onda situado no espectro infravermelho, acoplado a um fotodetector através da fibra óptica plástica. Tanto o LED quanto o fotodetector foram envoltos por um invólucro de plástico preto, isolando-os de variações da luz externa. Os acopladores, contendo o LED e o fotodetector, variaram conforme o grupo de fibra utilizado, esticado ou dobrado (Figura 17). O sinal obtido foi computadorizado, utilizando-se o "software" LabView@ para o armazenamento e tratamento do mesmo.

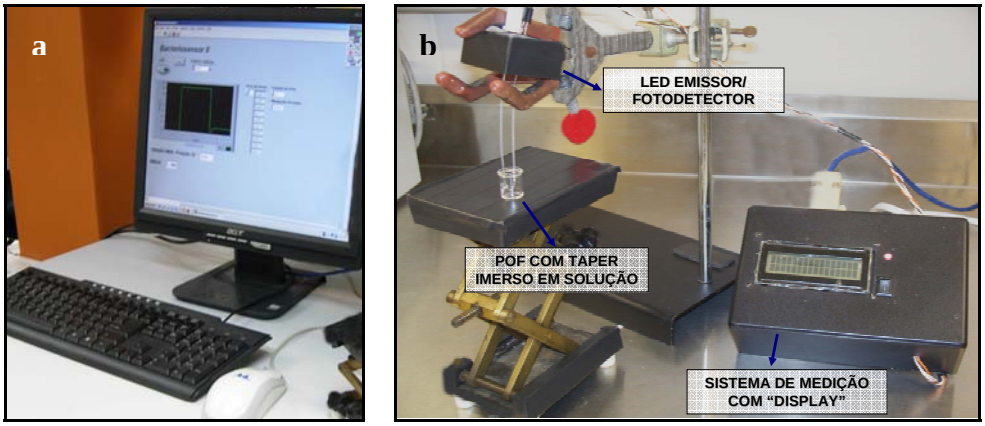

Figura 16. Sistema de medição e leitura empregado para avaliação do sensor. **a-** software desenvolvido, utilizando LabView@, para a visualização dos dados obtidos. **b-** caixa com microcontrolador a direita, responsável por transmitir os dados para o computador e invólucro com LED e fotodetector, com fibra acoplada.

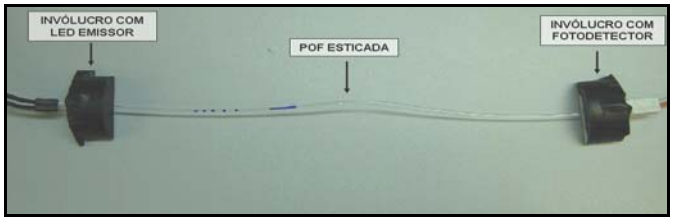

Figura 17. **Acopladores utilizados para as fibras apenas estiradas.**

4.3.4. Avaliação da sensibilidade do "taper" produzido

A sensibilidade das fibras a diferentes índices de refração foi analisada utilizando-se soluções com variadas concentrações de sacarose (Tabela 7). Uma vez que o sensor em questão foi desenvolvido para a medição de *Escherichia coli* em água buscou-se na literatura o índice de refração de um agregado de células bacterianas. Este foi determinado por VALKENBURG & WOLDRINGH (1984) como sendo 1,38, índice equivalente a uma massa densa de células(colônias confluentes recolhidas de duas placas de Petri, semeadas em toda sua superfície).

Tabela 7. Quadro de índices de refração obtidos com diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de sacarose (%)	Índice de refração correspondente
52	1,39
45	1,38
30	1,37
25	1,36
15	1,35

A região estirada de cada fibra foi imersa em água (utilizada como controle) ou solução de sacarose, utilizando-se câmaras de vidro para as fibras apenas estiradas e béqueres de vidro de 5 mL para as fibras dobradas. A luz foi injetada na fibra através do sistema descrito no item 4.3.3 e as mudanças na transmissão da luz, observadas durante estas interações, foram capturadas e analisadas através de um sistema eletrônico desenvolvido para este fim. Variações no índice de refração do meio alteraram o campo evanescente de luz, de acordo com a equação 1, modificando assim a potência óptica que atinge o fotodetector variando a voltagem detectada; as medidas obtidas foram divididas pelos valores observados na leitura do controle, fazendo-se uma relação entre o branco e o resultado (tensão/tensão). A medição da voltagem foi repetida dez vezes com o objetivo de excluir alterações relacionadas a acoplamento, manuseio e variações na intensidade da luz do LED, e expressa em média ou gráficos de dispersão.

4.4. Preparo da fibra para ligação dos anticorpos

Este foi realizado baseado na metodologia proposta por FIXE *et al.* (2004). Todas as etapas, até ligação dos anticorpos, foram feitas sob agitação. Esta técnica incluiu as etapas descritas a seguir.

4.4.1. Limpeza das fibras

As fibras foram limpas com isopropanol 99% por 5 minutos, sendo, em seguida, lavadas com água ultrapura e finalmente com tampão borato pH 11,2.

4.4.2. Aminação da POF para ligação da proteína A

As POFs foram incubadas em hexametilenodiamina a 10% (diluída em tampão borato pH 11,2) por 2 horas à 30ºC (Figura 18). Após três lavagens com tampão borato, as fibras foram secas por, no mínimo, 3 horas à 37ºC.

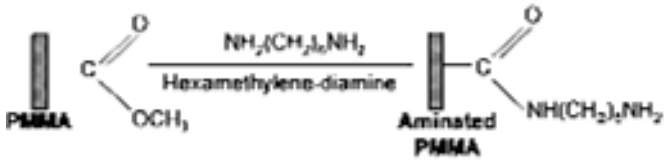

Figura 18. Representação esquemática das reações químicas envolvidas na aminação do PMMA. Adaptado de FIXE *et al.*, 2004.

4.4.3. Ativação da superfície aminada da POF

Sobre a superfície da POF foi adicionada uma solução de glutaraldeído a 2,5% (diluído em tampão fosfato pH 7,4) por 2 horas à 30 ºC (Figura 19). Após esse período a fibra foi lavada três vezes com tampão fosfato pH 7,4, seguida por secagem em estufa por, 3 horas à 37º C.

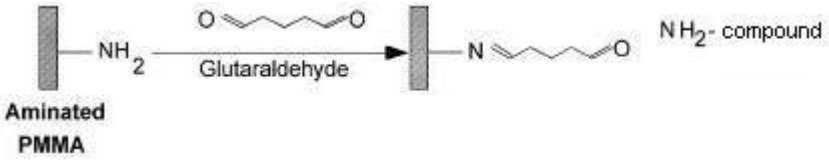

Figura 19. Representação esquemática das reações químicas envolvidas na formação de ligação entre o composto aminado e o glutaraldeído. Adaptado de FIXE *et al.*, 2004.

4.4.4. Ligação covalente de proteína A ao PMMA

As fibras foram incubadas com solução de proteína A (SIGMA, P3061), que tem como origem a parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus* a 0,05 mg/mL (diluída em solução de carbonato de sódio pH 9,5-0,5M) por 16-18 horas à 30º C.

4.4.5. Bloqueio dos sítios inespecíficos da superfície da fibra

Com o objetivo de bloquear possíveis ligações inespecíficas à superfície das fibras foi realizado o tratamento das mesmas com BSA 3% ou leite em pó desnatado (Mollico) 5% por 1 hora à 30ºC.

4.5. Ligação dos anticorpos à fibra

O anticorpo policlonal (IgG-Pab) de camundongo, anti-*E. coli* O:55 foi obtidos comercialmente (USbiological, Rio de Janeiro - RJ). Incubado por 1 hora, com a fibra adsorvida de proteína A, à 30ºC, sendo a fibra, após este período, lavada três vezes com solução salina (NaCl 0,85%).

4.6. Avaliação das etapas do processo químico por Microscopia de Força Atômica

Amostras de fibras em diferentes fases do tratamento para ligação dos anticorpos, descrita no item 4.4, e com anticorpos ligados à sua superfície, descrita no item 4.5, foram fixadas em suportes adequados e visualizadas em microscópio de força atômica (JPK instruments, modelo H-01-0086). O objetivo da utilização desta técnica foi a visualização das modificações ocorridas na superfície das fibras ópticas ao longo do tratamento químico. Uma fibra sem tratamento foi utilizada como controle negativo. As imagens geradas foram analisadas para verificação de modificações ocorridas na superfície das fibras, devido às etapas de tratamento químico.

4.7. Teste de ligação das bactérias à fibra

4.7.1. Estirpes bacterianas utilizadas

Estirpes bacterianas foram obtidas da bacterioteca do laboratório de "Microbiologia de Alimentos", no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes e selecionadas para a realização deste trabalho. Estas foram mantidas através de cultivo seriado, em meio Agar Nutriente, e estocadas em Caldo BHI contendo 10% de glicerol a -20 ºC. A estirpe *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC-25922, sorotipo O:55 foi utilizada, além de bactérias dos gêneros *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-700603), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212) e *Citrobacter freundii*, selecionadas ao longo do trabalho e usadas como controles negativos.

4.7.2. Procedimento de ligação das bactérias às fibras

As fibras, tratadas e com anticorpos ligados à superfície, foram expostas a suspensões bacterianas em água destilada, contendo 10^8 UFC / mL, por 1hora à 30ºC.

4.8. Determinação da ligação das bactérias à superfície das fibras

4.8.1. Avaliação por Microscopia Óptica

Para a verificação da fixação das bactérias e relativa quantificação da ligação, as fibras foram coradas com fucsina sódica (solução a 1%) por 30 segundos e em seguida lavadas duas vezes com água destilada. Após secagem a 24°C ± 1°C a fibra foi observada ao microscópio óptico (Olympus, Tokyo. KHC-207269).

4.8.2. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a verificação da fixação das bactérias e da disposição das mesmas ao longo da superfície, as fibras foram preparadas para visualização por microscopia eletrônica de varredura (JEOL; modelo JSM 5310). As amostras foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato (0,1 M) por 2 horas a 24°C ± 1°C. Em seguida, foram lavadas com tampão Cacodilato e incubadas por 1 hora em Tetróxido de Ósmio a 1%. Após esta incubação a lavagem com o tampão cacodilato foi repetida, sendo em seguida feita a desidratação gradativa até etanol 100% (30, 50, 70, 90 e 100%, incubando por quinze minutos a cada concentração, trocando o álcool 100% três vezes). A secagem do material foi feita a vácuo. As amostras foram então metalizadas com ouro e visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. Foi feito controle positivo, fibras tratadas quimicamente, porém sem anticorpos em sua superfície, foram pressionadas contra cultura bacteriana (em placa de Petri), visando a observação de uma fibra completamente coberta com bactérias, ainda que inespecificamente.

4.9. Avaliação da atenuação do sinal causada pela ligação das bactérias à fibra

Utilizou-se, para avaliação da atenuação do sinal, o mesmo conjunto óptico-eletrônico empregado para a realização das medições das soluções de sacarose, formado por uma fonte de luz (LED), um fotodetector (Fotec, modelo FM 300) e um circuito eletrônico acoplado ao detector, possibilitando a transmissão através da fibra das possíveis variações do sinal, descrita no item 4.3.3. O teste foi realizado em béqueres de 5 mL contendo a suspensão bacteriana (*E. coli*) em água destilada, colocada em contato com a fibra teste, coberta de anticorpos (região do "taper"), por 50 minutos a 30ºC. Após 30 minutos de incubação a suspensão foi homogeneizada. Como controle negativo, água destilada e fibras não cobertas com os anticorpos foram empregadas. Houve a aquisição constante dos dados, através do sistema de medição descrito no item 4.3.3, para armazenagem e posterior análise dos mesmos.

4.10. Determinação da sensibilidade do sensor

A sensibilidade do sensor desenvolvido foi estabelecida utilizando-se diferentes concentrações de *E. coli*, seguindo o protocolo descrito anteriormente, no item 4.8, para a avaliação da atenuação do sinal.

Foram preparadas suspensões de *E. coli* com diferentes concentrações, de 10^3 a 10^8células/mL. Após o tratamento das fibras e ligação dos anticorpos específicos, as fibras foram imersas nestas suspensões e o sinal obtido foi armazenado e expresso através de gráficos.

4.11. Amplificação do sinal obtido pela ligação das bactérias ao sensor

4.11.1. Sensibilização de partículas de látex

Com o objetivo de amplificar o sinal do sistema obtido com as menores concentrações de *E. coli* (10^4 e 10^3células/mL), foram utilizadas partículas de látex vermelhas (K080-ESTAPOR, França) de 0,8 μm, diluídas para 1% em tampão GBS, sensibilizadas com a suspensão de anticorpos monoclonais de coelho (1:2) por 2 horas a 37ºC (BLOOMFIELD, GORDON & ELMENDORF, 1963). Em seguida as partículas foram lavadas com tampão GBS, por duas vezes e resuspendidas no mesmo para a metade do volume inicial.

4.11.2. Avaliação da capacidade de ligação das partículas às bactérias

As partículas de látex foram colocadas em superfície contendo *E. coli*, sendo a aglutinação visualizada por lupa (NIKON - modelo SMZ-1). O mesmo procedimento foi realizado com as bactérias controle *Klebsiella pneumoniae*.

4.11.3. Interação de partículas de látex com bactérias ligadas às fibras

Após tratamento da fibra e ligação das bactérias, foi adicionada a suspensão de partículas de látex (1%) sensibilizada e foram incubadas em béquer de 5 mL à 24°C ± 1°C por 1 hora. A suspensão foi homogeneizada após 30 minutos de incubação. Fibras não tratadas com suspensão de anticorpos foram utilizadas como controle negativo. Houve a aquisição constante dos dados, através do sistema de medição descrito no item 4.3.3, para armazenagem e posterior análise dos mesmos.

4.12. Durabilidade dos anticorpos ligados à superfície das fibras

Para avaliar a durabilidade dos anticorpos ligados a superfície das fibras foram preparadas 25 amostras de fibras dobradas, sendo todas tratadas com Pab de camundongo anti-*E.coli*, conforme descrito no item 4.5 e armazenadas a 4ºC em salina (0,85%). A cada semana 3 amostras foram imersas em suspensão de *E. coli* com 10^8 células/mL, os resultados obtidos foram armazenadas e analisados, sendo expressos na forma de gráficos.

4.13. Avaliação do potencial de reciclagem dos sensores

Com o objetivo de se avaliar a possibilidade de reutilização das fibras, o que possibilitaria menores custos, foi realizado o procedimento de religamento dos anticorpos à superfície das fibras após remoção química dos mesmos. Desta forma, 3 amostras de fibras dobradas foram tratadas e tiveram anticorpos (Pab) ligados em suas superfícies, conforme descrito no ítem 4.5. Estas foram colocadas em contatco com suspensões de *E. coli* (10^8 células/mL) e a potencia óptica transmitida avaliada conforme descrito anteriormente. Após este processo tais fibras foram imersas em solução de glicina a 0,1 M, pH 2,5, por 10 minutos à 24°C ± 1°C, com o objetivo de desligar os anticorpos da superfície das fibras. Houve a neutralização do meio através da lavagem das fibras (3 vezes) com PBS - pH 7,4 - e nova interação com anticorpos, avaliando-se a possibilidade de religamento dos anticorpos à superfície das fibras reutilizadas. O processo de ligação de anticorpos foi repetido três vezes consecutivas com as mesmas fibras.

4.14. Determinação da especificidade do sensor

Para a determinação da especificidade do sensor suspensões bacterianas, com 10^8 células/mL de diferentes gêneros da família Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae* (ATCC-700603), *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212 e *Citrobacter freundii*), foram postas em contato com fibras tratadas e ligadas com os anticorpos específicos para *E. coli.* Foram feitas interações apenas com suspensões das bactérias determinadas acima ou juntamente com suspensões de *E. coli* (% v/v), visando avaliar a real especificidade do sensor.

4.15. Interferência de fatores ambientais nos processos de ligação e detecção da bactéria

Uma vez que o sensor será utilizado em análises de amostras ambientais, que podem apresentar diferentes características físico-químicas, fatores ambientais capazes de interferir na leitura destas amostras foram estudados. Desta forma, suspensões de *E. coli* foram preparadas em água com diferentes pHs (5,0 e 8,0), temperaturas (16ºC e 25ºC) e durezas

(água mole e água moderadamente dura, conforme Ministério da Saúde, 2006). Fibras dobradas foram interagidas com estas suspensões e os sinais obtidos foram armazenados, avaliados e expressos na forma de gráficos.

5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Material utilizado como base para o imunossensor

Grande parte dos estudos disponíveis na literatura aborda a fabricação de biossensores tendo como base fibras ópticas de sílica, o que pode ser atribuído à variedade de fibras com este material e à sensibilidade apresentada pelas mesmas (RIJAL *et al.*, 2005). Porém, as fibras plásticas, material utilizado neste estudo, apresentam características como a facilidade de manuseio, a possibilidade de emprego de temperaturas mais baixas para modificações em sua estrutura e a menor fragilidade, especialmente quando feita a exposição do campo evanescente, que justificam sua utilização. Tais propriedades foram verificadas neste estudo assim como em trabalhos de WONG *et al.* (2003) e LYE *et al.* (2005). Os resultados obtidos no presente estudo, com relação à sensibilidade apresentada pelas fibras de PMMA, indicaram que este material foi suscetível às modificações químicas, como a aminação ocorrida em sua superfície. Fato compatível com estudos como de MERCHANT, SCULLY & SCHMITT (1999) e WONG *et al.* (2003).

A máquina de estiramento desenvolvida permitiu a produção de "tapers" e a utilização do ferro de solda possibilitou a curvatura das fibras de forma reprodutível (Figura 20).

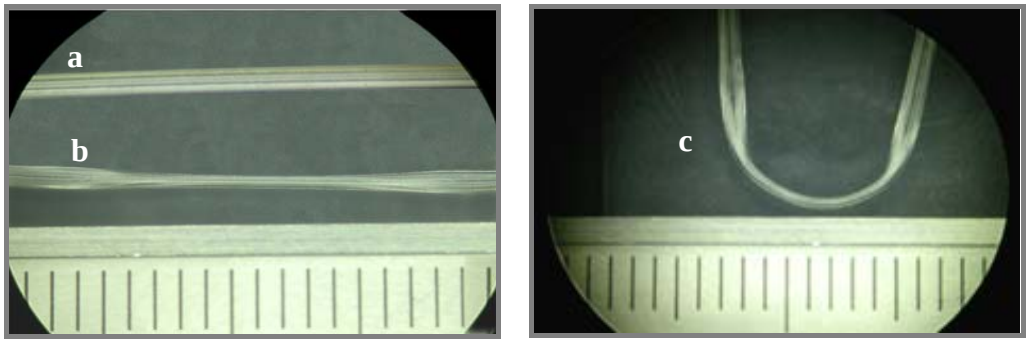

Figura. 20 – Fibras após processo de tração sob aquecimento. a- Fibra controle, sem nenhum tipo de tratamento; **b-** Fibra após tração; **c-** Fibra dobrada após estiramento.

Como esperado houve aumento da sensibilidade com o estiramento, fato que pode estar relacionado tanto à perda da casca, como proposto por MERCHANT; SCULLY & SCHMITT (1999) na Figura 21, quanto à sua diminuição como demonstrado por GUO *et al.* (2009) na Figura 22, o que proporcionaria um aumento do campo evanescente e consequente aumento da sensibilidade. Porém no segundo caso, pode haver um menor escapamento dos

feixes luminosos da guia de onda (fibra), resultando em uma melhor interação do campo evanescente com o meio.

Figura 21. Afilamento da fibra óptica plástica. Esquema sugerindo remoção da casca. Adaptado de MERCHANT; SCULLY & SCHMITT (1999).

Figura 22. "Taper" formado na fibra óptica. Esquema sugerindo diminuição da casca Adaptado de GUO *et al.* (2009).

Trabalhos, como o de LEUNG *et al.* (2006), empregando fibras de sílica, abordam a confecção do "taper" utilizando uma chama de propano e pesos nas extremidades da fibra, de forma que com o aquecimento do centro da mesma, os pesos proporcionaram o afilamento da região central. Ainda que a elaboração do "taper" se faça possível, pode-se observar pelas medidas apresentadas no trabalho que não há reprodutibilidade. A adequação de uma máquina, normalmente empregada no acoplamento de fibras, também é sugerida, mesmo nesse caso emprega-se pesos para uma maior precisão na formação do "taper" (KHIJWANIA & GUPTA, 1999; LEUNG *et al*., 2006; MARALDO, SHANKAR & MUTHARASAN, 2006). O afilamento químico também é sugerido, para fibras de sílica (FERREIRA, WERNECK & RIBEIRO, 2001) e de plástico (WONG *et al.,* 2003). No segundo caso, apesar do autor defender que a utilização de solventes, para diminuição da casca, proporcione fibras com medidas mais regulares, os ensaios com diferentes índices de refração demonstram que a sensibilidade do sensor é baixa (detecção de índices acima de 1,46), o que impossibilitaria sua utilização para detecção de diversos analitos. A remoção de grande parte da casca pode ser a responsável por esta baixa sensibilidade. No presente estudo, não foi possível determinar se houve a remoção ou diminuição da casca através das técnicas empregadas. Devido à sensibilidade apresentada nas leituras, de diferentes índices de refração e suspensões

bacterianas (demonstradas em tópicos seguintes), a permanência da casca pode ser sugerida, porém é necessária a utilização de técnicas que confirmem o verdadeiro estado da casca.

A dobra do "taper" de algumas fibras foi feita com o intuito de se aumentar a sensibilidade do sensor, através do aumento da profundidade do campo evanescente (Figura 23), pois alguns modos, ou feixes de luz, tornam-se perdulários ao entrarem em contato com a dobra. Isto ocorre devido ao aumento do ângulo de incidência (θ_2) na região de dobra na interface núcleo-casca , sendo este menor do que o ângulo crítico Desta forma, ainda que as alterações na casca sejam pequenas, ou não ocorram, haverá interação suficiente com o meio para haver a detecção de alterações.

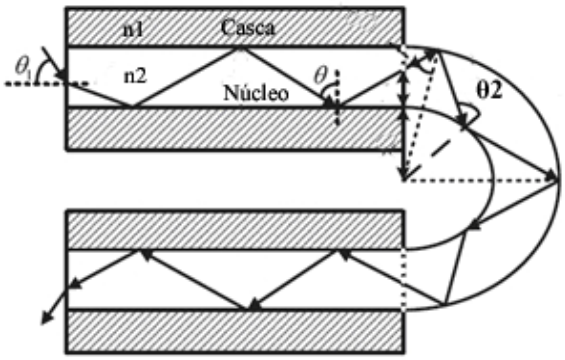

FIGURA 23. Estrutura da fibra óptica em formato de U. Adaptado de WANG *et al.* (2009).

A utilização do ferro quente de solda foi uma solução encontrada para um menor manuseio das fibras e consequentemente menor agressão da superfície, evitando a formação de depressões como as verificadas no estudo de GENG, MORGAN & BHUNIA (2004), que podem levar à uma detecção equivocada do analito, seja por concentração do elemento de reconhecimento, seja pela concentração do próprio analito nestas áreas. A utilização do ferro também visou à obtenção de uma melhor reprodutibilidade. O método de curvatura empregando uma chama, utilizado em alguns trabalhos como de WANG *et al.* (2009), dificulta a reprodução e leva a maior perda de material.

5.2. Avaliação da superfície das fibras por microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas por MEV não revelaram modificações ou danos físicos aparentes oriundos dos processos de estiramento ou de dobra, tanto as superfícies das TF (Figura 24) quanto das TUF (Figura 25) mantiveram-se intactas. A utilização de cola de prata, para fixação das amostras de fibra, originou desníveis ao longo do "taper". Uma vez que a substituição deste produto por fita de carbono não revelou modificações na superfície do "taper", assim como fibras sem "casca" também permaneceram intactas, pode-se inferir que a

cola de prata provocou deformação no material das fibras ao reagir com a "casca" presente na superfície.

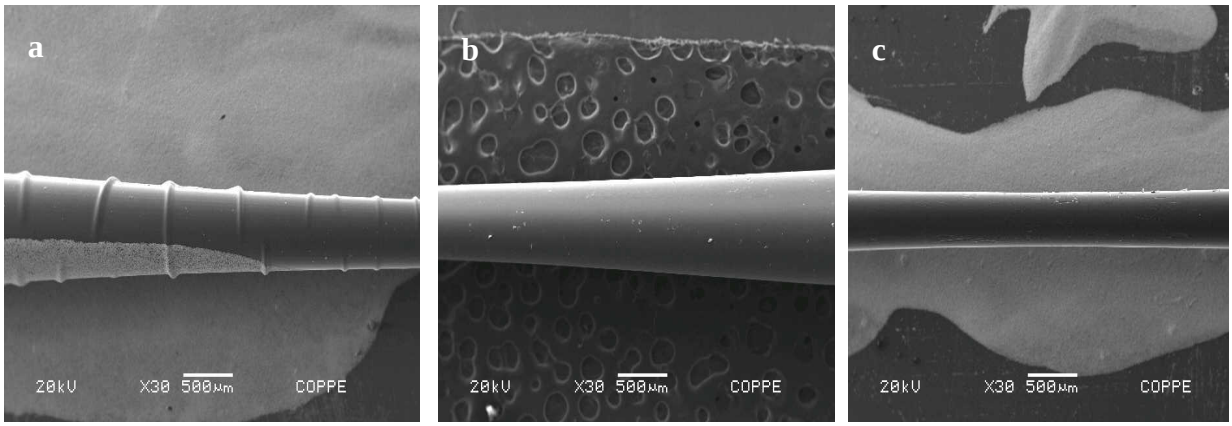

Figura 24. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a- Fibra esticada com casca imobilizada com cola de prata, para produção das fotos. b- Fibra esticada com casca imobilizada com fita de carbono. c- Fibra esticada sem casca imobilizada com cola de prata. A associação das irregularidades com reações entre a casca e a cola de prata fica indicada pela análise da seqüência de imagens.

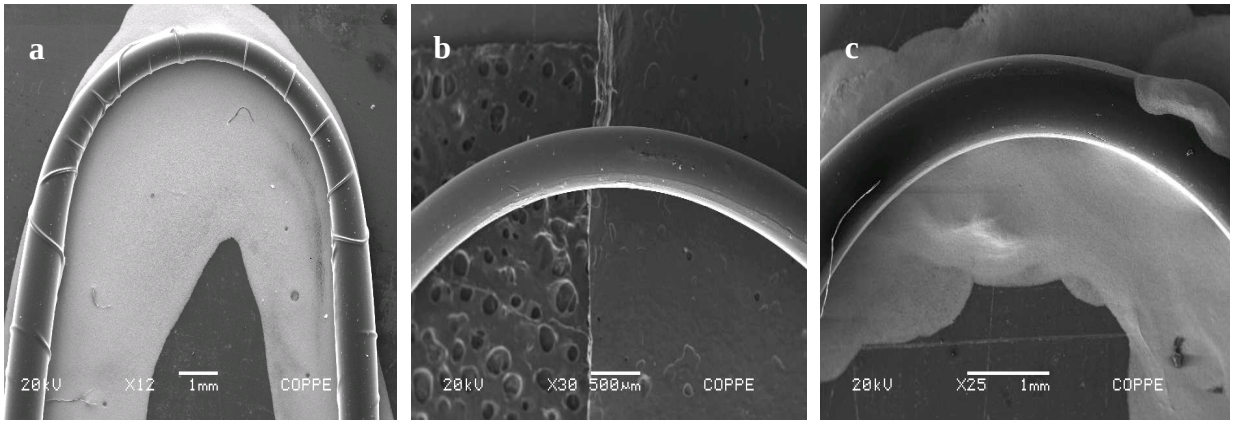

Figura 25. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a- Fibra dobrada com casca imobilizada com cola de prata, para produção das fotos. b- Fibra dobrada com casca imobilizada com fita de carbono. c- Fibra dobrada sem casca imobilizada com cola de prata. A associação das irregularidades com reações entre a casca e a cola de prata fica indicada pela análise da seqüência de imagens.

5.3. Caracterização geométrica dos "tapers"

As medidas das regiões sensíveis apresentaram variações segundo a potência empregada, o tempo de aquecimento e o número de passos executados pelos motores da máquina de afilamento.

A caracterização das fibras, feita através do "software" ImageProPlus®, possibilitou a determinação de alguns parâmetros (**a**, **b**, **c** e **d**), conforme demostrado na Figura 15 a serem

considerados para comparação entre as fibras, algumas medidas podem ser visualizadas na Tabela 8. As variações, ocasionadas pelo processo, possibilitaram correlações entre os parâmetros e a determinação das medidas mais adequadas para a produção das fibras a serem usadas no sensor em questão. Pode-se observar que as laterais dos "tapers" (a e b) apresentaram variações pequenas em cada fibra. A relação destes parâmetros é dada por a/b na Tabela 8.

As fibras foram catalogadas conforme o dia de produção das mesmas, assim a fibra denominada A-1 equivale à primeira fibra produzida no primeiro dia de utilização da máquina, além de serem divididas em grupos de fibra com "taper", ou "tapered fiber" (TF), e fibra com "taper" em formato de U ou "tapered U-shaped fibers" (TUF).

Tabela 8. Medidas obtidas através do "software" ImageProPlus® de fibras com diferentes geometrias

Grupo-Número	Diâmetro (d)	Lado direito (b)	Lado esquerdo (a)	Comprimento (c)	a/b
TF/Q-12	0,41	1,0674	1,0509	13,66	0,98
TF/Q-39	0,42	1,0311	0,9492	13,37	0,92
TF/I-51	0,44	0,9814	1,0370	13,72	1,06
TF/Q-02	0,48	0,8204	0,8487	13,49	1,03
TF/I-31	0,45	1,0169	0,9998	14,88	0,98
TF/I-34	0,44	1,0397	1,0586	15,82	1,02
TF/G-31	0,47	0,9245	0,9245	12,58	1,00
TUF/N-28	0,39	0,9348	1,0327	14,11	1,10
TUF/N-07	0,37	1,0868	1,0976	14,37	1,01
TUF/Q-34	0,45	1,0065	0,9820	12,01	0,98
TUF/O-06	0,45	0,9593	0,9919	12,15	1,03
TUF/H-01	0,49	0,9900	1,0007	12,63	1,01
TUF/I-22	0,60	0,8345	0,8204	14,54	0,98
TUF/I-44	0,55	0,8911	0,9760	14,25	1,10

TF – "tapered fibers"; TUF – "tapered U-shaped fibers". O número de cada fibra está relacionado a seu dia e ordem de fabricação. Os parâmetros diâmetro (d), comprimento dos "tapers" (c) e os diâmetros de suas extremidades (a e b) foram utilizados para avaliação e comparação das fibras através da análise da relação entre estes parâmetros (a/b).

5.4. Análise da sensibilidade das fibras a diferentes índices de refração

As fibras foram avaliadas quanto aos parâmetros diâmetro, comprimento e laterais formadas após o estiramento. As fibras esticadas com diâmetros acima de 0,55 mm foram inicialmente testadas, porém não apresentaram sensibilidade para a detecção das soluções de sacarose utilizadas. As mesmas demonstraram-se sensíveis apenas entre os diâmetros 0,40 e 0,54 mm (Figura 26), indicando que a modificação deste parâmetro foi suficiente para o aumento da sensibilidade do sistema, sem a alteração considerável de outras dimensões.

A falta de sensibilidade da fibra esticada com diâmetros maiores pode estar relacionada à manutenção da casca com sua espessura original, o que impediria uma maior interação do campo evanescente com o meio. Fibras com diâmetros abaixo de 0,40 mm dificultam o manuseio, pois quebram com facilidade, por isso não foram consideradas para avaliação, além de apresentarem grande perda luminosa, dificultando a análise do meio. Estas variações também foram observada por RIJAL *et al*, 2005 com fibras ópticas de sílica, neste trabalho o autor observou que as variações de geometria das fibras são relacionadas às diferentes leituras frente a uma mesma concentração de *E. coli.*

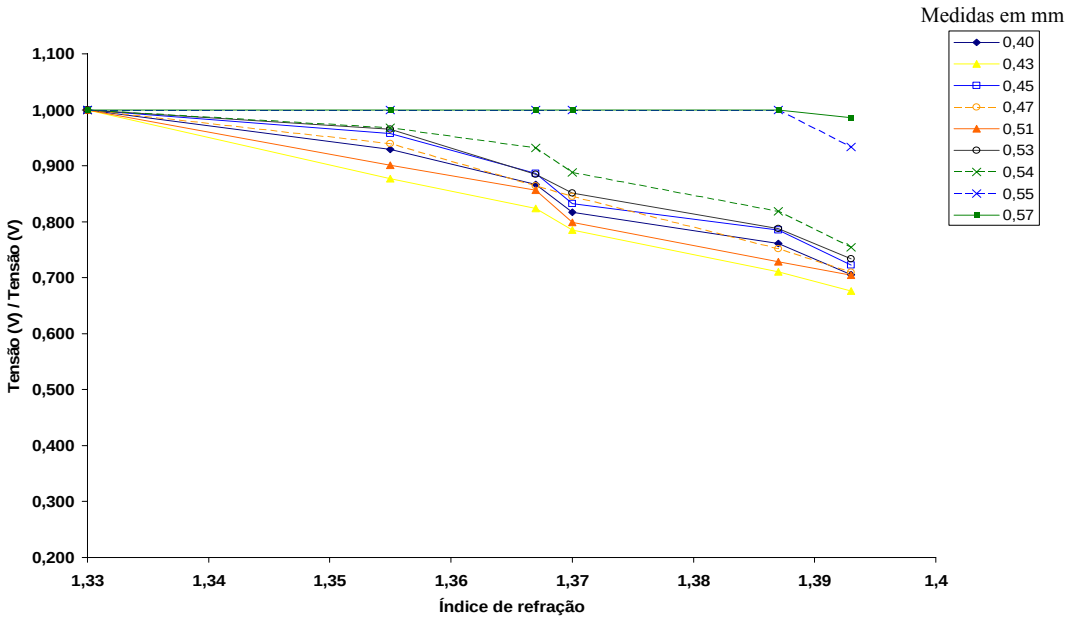

Figura 26. Determinação da sensibilidade dos sensores, fibras esticadas, frente a diferentes índices de refração. Cada linha representa a média de duas fibras com o diâmetro indicado pela cor.

Em contrapartida, as fibras dobradas foram capazes de detectar as modificações ocorridas no campo evanescente ainda que com maiores diâmetros, Figura 27.

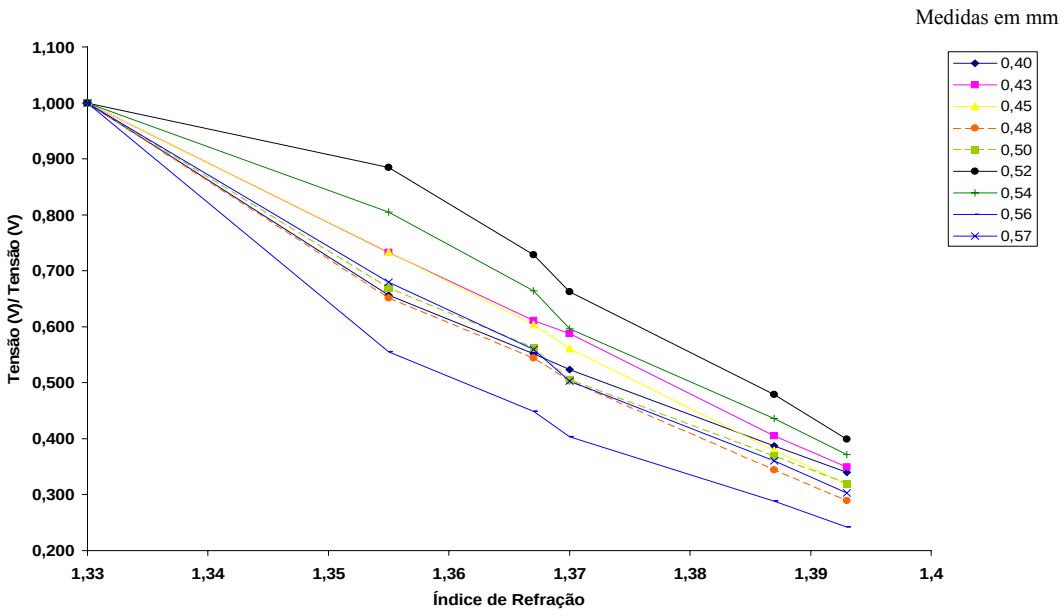

Figura 27. Determinação da sensibilidade dos sensores, com fibras dobradas, frente a diferentes índices de refração. Cada linha representa a média de duas fibras com o diâmetro indicado pela cor.

Apesar de haver variações no gráfico da Figura 27, como a maior atenuação da tensão (V/V) apresentada pelas fibras com diâmetro 0,56 mm, em comparação com as outras fibras, pode ser observada uma homogeneidade dos resultados (maior linearidade da variação da tensão detectada em relação aos índices de refração testados). Este fato indica que a sensibilidade das TUF não sofre grande alteração com as modificações geométricas.

Com relação ao comprimento dos "tapers", as TF mostraram uma variação maior, durante as leituras das soluções de sacarose, do que as TUF (Figuras 28 e 29). Pode ainda ser observado que as fibras TF com comprimento de 14 e 15 mm apresentaram menor sensibilidade na leitura de todos os índices de refração, enquanto fibras com 11 mm não leram as soluções com índices muito próximos ao da água (1,33). Sendo assim, os comprimentos 12 e 13 mm podem ser considerados os ideais para a construção do sensor.

As TUF apresentaram comportamento semelhante, sendo que, neste caso, fibras com 11 mm de comprimento apresentaram menor sensibilidade do que as fibras com 12 e 13 mm em todos os pontos do gráfico. Os extremos avaliados, 11, 14 e 15 mm, apresentaram menor sensibilidade em todos os pontos. Desta forma, pode-se aferir que fibras com "taper" muito curto podem não interagir da maneira tão eficiente com o meio, enquanto fibras cujo comprimento de "taper" fique acima de 14 mm, podem determinar perdas excessivas de luz, dificultando o retorno dos feixes para o interior das fibras.

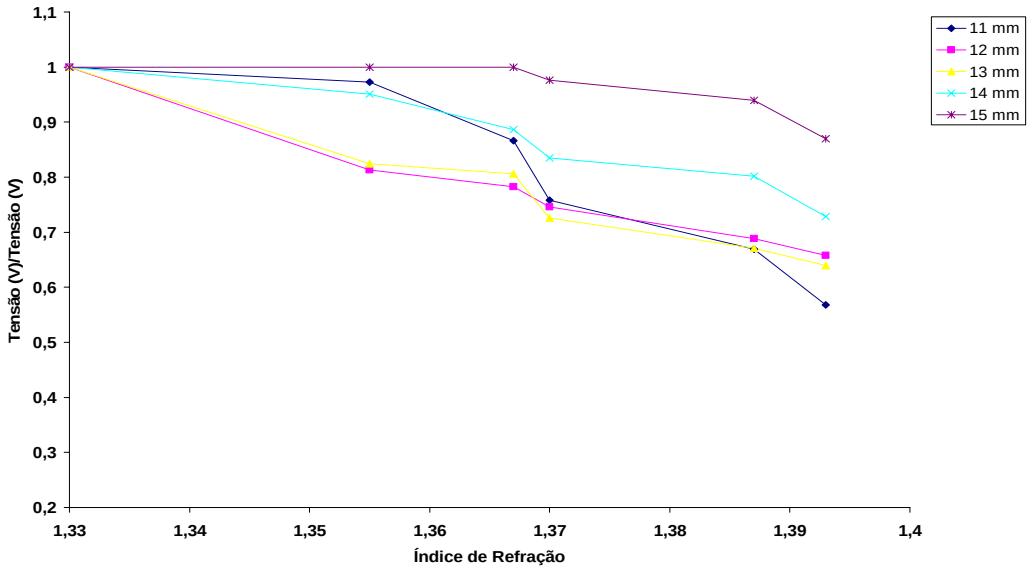

Figura 28. Fibras esticadas, com "tapers" variando de 11 mm a 15 mm de comprimento, analisadas frente a diferentes índices de refração.

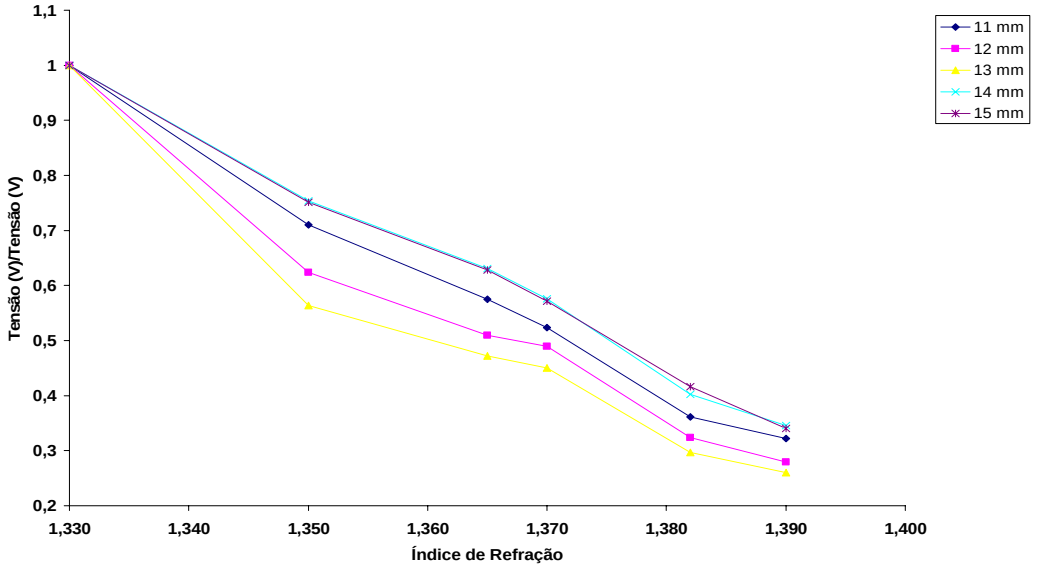

Figura 29. Fibras dobradas, com "tapers" variando de 11 mm a 15 mm de comprimento, analisadas frente a diferentes índices de refração.

O processo de dobra não provocou modificações no comprimento dos "tapers", a média dos comprimentos foi de 13,44 mm e 13,43 mm, fibras esticadas e dobradas respectivamente (análise feita em 40 fibras de cada grupo).

A análise das laterais dos "tapers" (parâmetros a e b mostrados na Tabela 7) foi um dos indicativos da reprodutibilidade no afilamento das fibras, assim como da adequação da máquina utilizada. A relação entre as extremidades (**a/b**), medida importante para a determinação do "taper", apresentou valores em torno da unidade, com média 1,01 mm e desvio padrão 0,05 para fibras esticadas e dobradas (análise feita em 40 fibras de cada grupo).

5.5. Análise da estabilidade de leitura

As fibras apresentaram reprodutibilidade de leitura quando a mesma fibra foi submetida a 10 leituras, tanto para TF, fibra esticada Q-2 com 0,47 de diâmetro (Figura 30), quanto para TUF, fibra dobrada N-28 com 0,38 de diâmetro (Figura 31). Indicando que o manuseio das fibras, incluindo desacoplamento e acoplamento das mesmas, não interferiu de forma a modificar os padrões de leitura observados. Assim a variação entre as leituras em ambos os casos foi pequena, sendo a das fibras dobradas aparentemente menor do que das fibras esticadas.

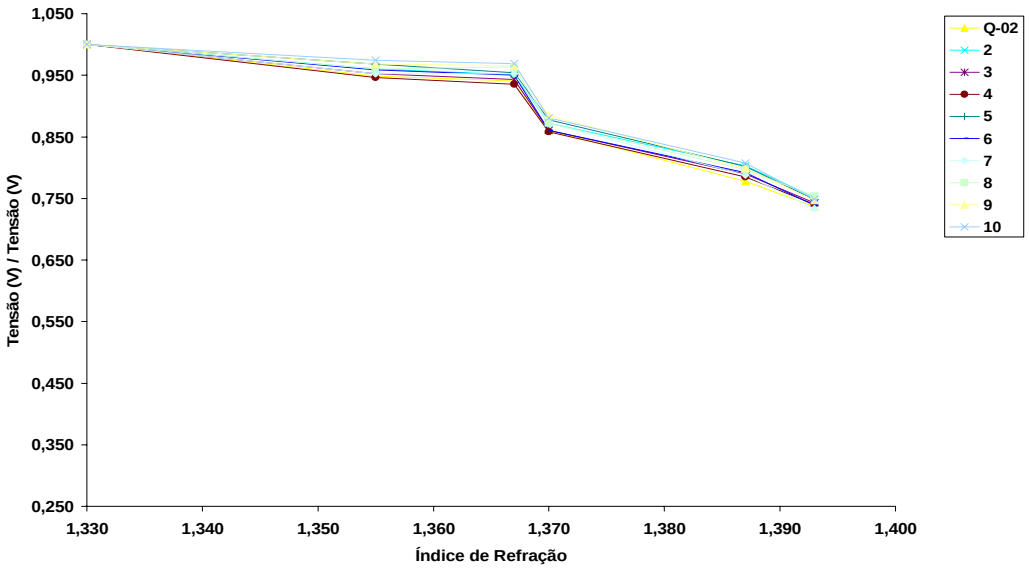

Figura 30. Análise da estabilidade de leitura da fibra esticada Q-2 frente a diferentes índices de refração. Fibra com 0,47 mm de diâmetro, leitura repetida 10 vezes.

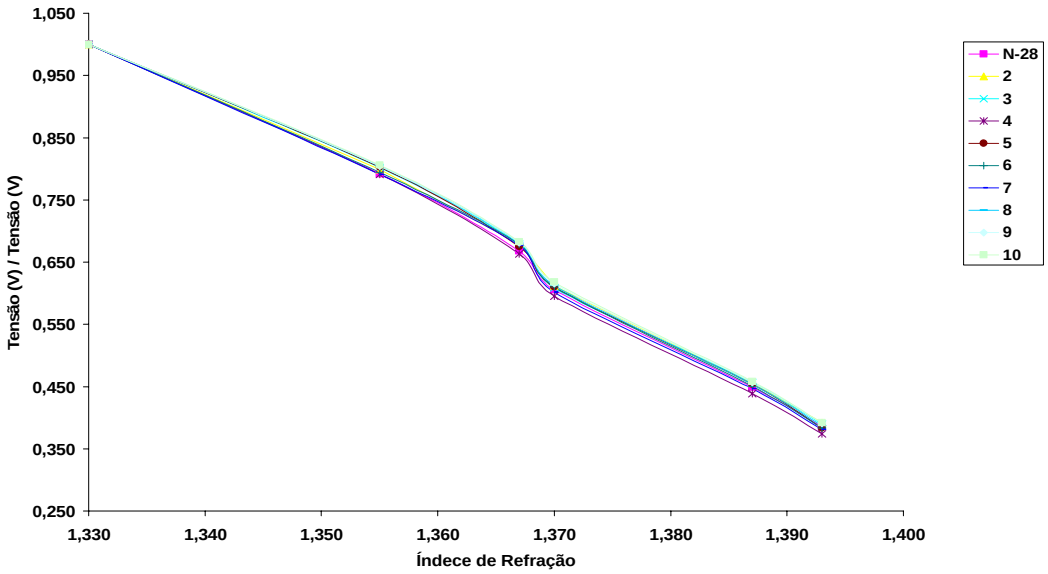

Figura 31. Análise da estabilidade de leitura da fibra esticada N-28 frente a diferentes índices de refração. Fibra com 0,38 mm de diâmetro, leitura repetida 10 vezes.

As fibras apresentaram estabilidade de leitura tanto quando uma mesma fibra foi lida diversas vezes, como mostrado anteriormente, quanto quando diferentes fibras foram lidas diversas vezes e comparadas entre si (Figuras 32 e 33). Fica evidente na análise destes gráficos a diferença de sensibilidade entre os dois grupos de fibras (TF e TUF), a relação de tensão (V/V) correspondente a leitura do maior índice de refração analisado, das fibras TF ficou em torno de 0,750 V/V, enquanto que esta mesma relação ficou em torno de 0,400 V/V em relação às fibras TUF. Os dados de tensão fornecidos pelo sistema de medição e obtidos na análise de estabilidade de leitura, observados nos gráficos das Figuras 32 e 33, foram normalizados considerando-se os resultados de leitura na água, utilizada como controle negativo. Na Figura 32 é apresentada a expressão para a linearização das curvas obtidas para fibras esticadas; o coeficiente angular, representado pelo número -4,3406, é a medida da sensibilidade do grupo de fibras analisado. Pode-se observar que o coeficiente angular da expressão de linearização para o grupo de fibras dobradas foi -9,9493, sendo assim maior em módulo em relação ao grupo das fibras esticadas. Desta forma, obtem-se um parâmetro quantitativo que expressa a maior sensibilidade das fibras dobradas em relação às fibras esticadas.

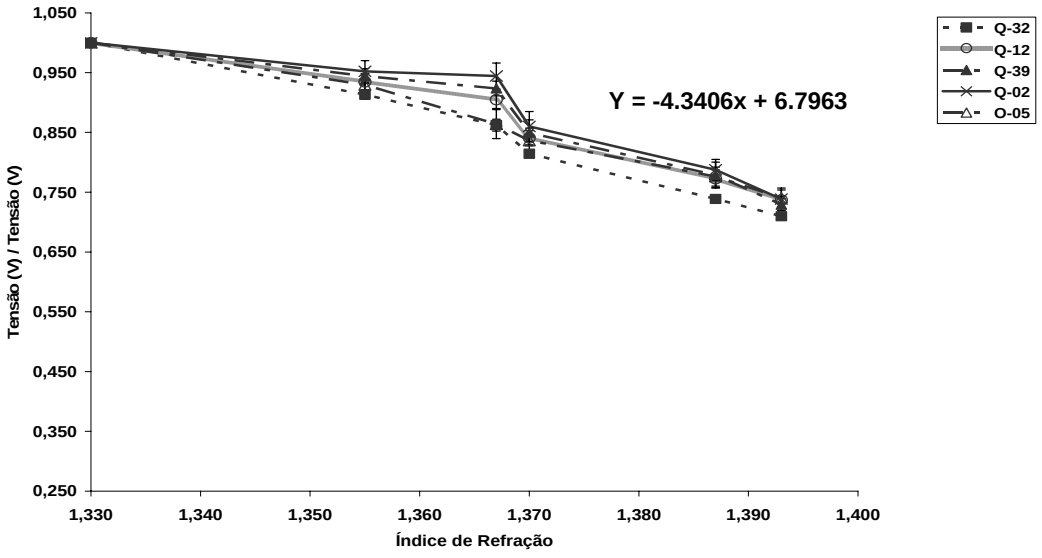

Figura 32. Relação da tensão obtida em função dos diferentes índices de refração utilizados (cada reta representa uma média de 10 repetições por fibras). Leituras feitas com fibras esticadas de diferentes diâmetros - Q-32 (0.42mm); Q-12 (0.42mm); Q-39 (0.42mm); Q-02 (0.47mm) e O-05 (0.36mm).

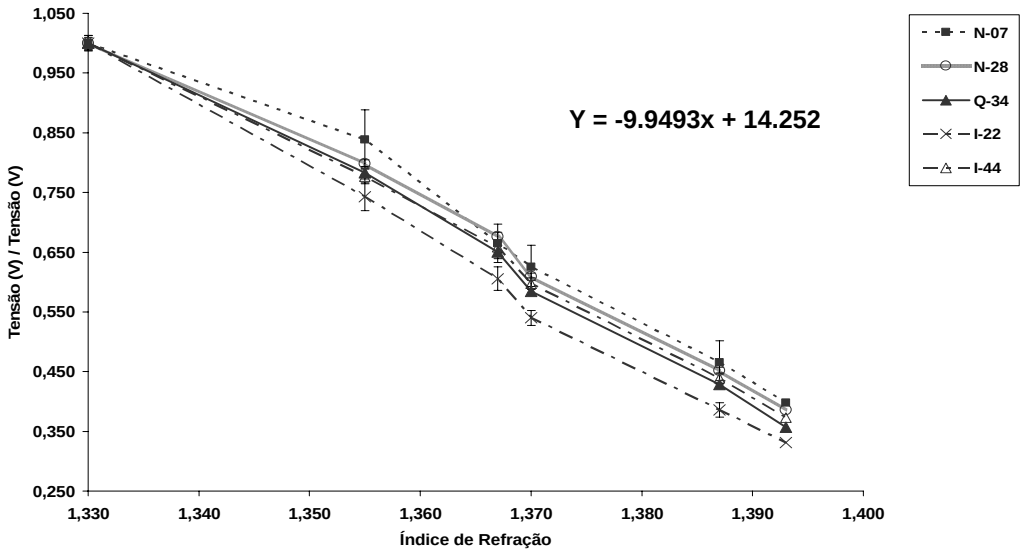

Figura 33. Relação da tensão obtida em função dos diferentes índices de refração utilizados (10 repetições por fibra). Fibras com diâmetros variáveis: N-07 (0,35mm); N-28 (0,38mm); Q-34 (0,45mm); I-22 (0,50mm) e I-44 (0,50mm).

Desta forma, devido à observação de uma maior estabilidade das fibras TUF, uma maior facilidade de manipulação e maior sensibilidade das mesmas, este foi o grupo de fibras selecionado para a elaboração do imunossensor.

5.6. Avaliação dos efeitos do tratamento químico e ligação de anticorpos na superfície das fibras por microscopia de força atômica

Fibras de PMMA apresentam sua superfície como um ambiente hidrofóbico com baixa capacidade de interação espontânea com outros materiais, o que pode ser interessante em analises de amostras ambientais (FINLAY *et al.*, 2002). No caso da necessidade de modificação de sua superfície, esta baixa interação pode ser contornada pela utilização de tratamentos químicos, como a aminação, o que torna a superfície da fibra favorável à ligação de proteínas (LI, HU & LIU, 2004, LYE *et al.,* 2005).

As diversas fases de tratamento químico da fibra, até a ligação dos anticorpos em sua superfície, foram visualizadas por microscopia de força atômica (Figura 34). O controle negativo foi feito com uma fibra sem tratamento (Figura 34a), apesar de apresentar algumas irregularidades, provindas provavelmente do manuseio excessivo, a superfície apresenta-se homogênea. Após o processo de estiramento e dobra (Figura 34b), a superfície deixou de ser homogênea, possivelmente devido ao calor utilizado para tração. O tratamento com HMDA não provocou modificações aparentes em relação à superfície após tracionamento (resultado não mostrado). Quando da utilização do glutaraldeído, a superfície ganhou um aspecto mais plano (Figura 34c). A ligação dos anticorpos foi verificada pelos pequenos pontos menores do que 1 μm (34d). A disposição dos anticorpos na superfície da fibra pode ser a resposta para a ligação irregular de bactérias ao longo da mesma, uma vez que as imagens revelam que os anticorpos não estão ligados de modo uniforme à fibra (formando um “tapete”). Este fato pode estar relacionado às ligações químicas ocorridas na superfície das fibras e a uma ligação irregular da proteína A, fato que deve ser investigado.

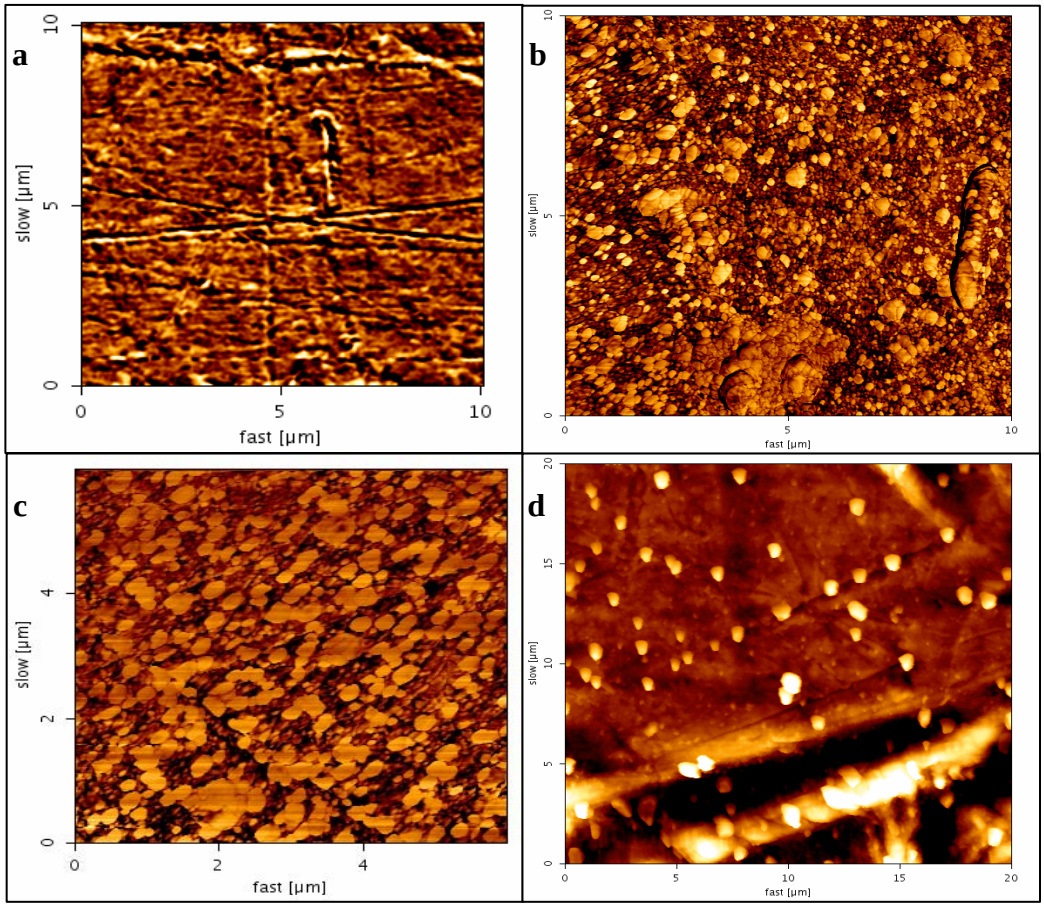

Figura 34. Fases de tratamento das fibras observadas por microscopia de força atômica. a- controle, superfície sem tratamento; b- superfície após processo de dobra; c- após tratamento com glutaraldeído; d- com anticorpos ligados à superfície.

5.7. Confirmação de ligação de bactérias à superfície das fibras

A determinação da presença das bactérias, ligadas pelos anticorpos à superfície das fibras, foi feita por microscopia ótica (Figura 35) e por microscopia eletrônica de varredura (Figura 36). A coloração por fucsina, feita no primeiro caso, possibilitou a verificação das bactérias, pontos vermelhos. Com o uso da microscopia eletrônica pode-se verificar a formação de pequenos grupos bacterianos na superfície (Figura 36 a e b). Como controle positivo foram utilizadas bactérias ligadas inespecificamente à fibra (fibra sem anticorpos), o que possibilitou a visualização de uma camada uniforme de bactérias (Figuras 36 c e d), idealizando como ficaria uma fibra completamente coberta com anticorpos funcionais e consequentemente coberta com bactérias.

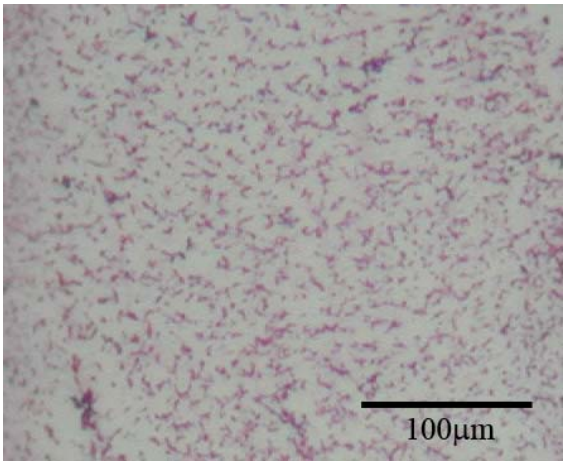

Figura 35. Imagem por microscopia óptica de ligação de *E.coli,* à superfície da fibra adsorvida de anticorpos, corada com fucsina.

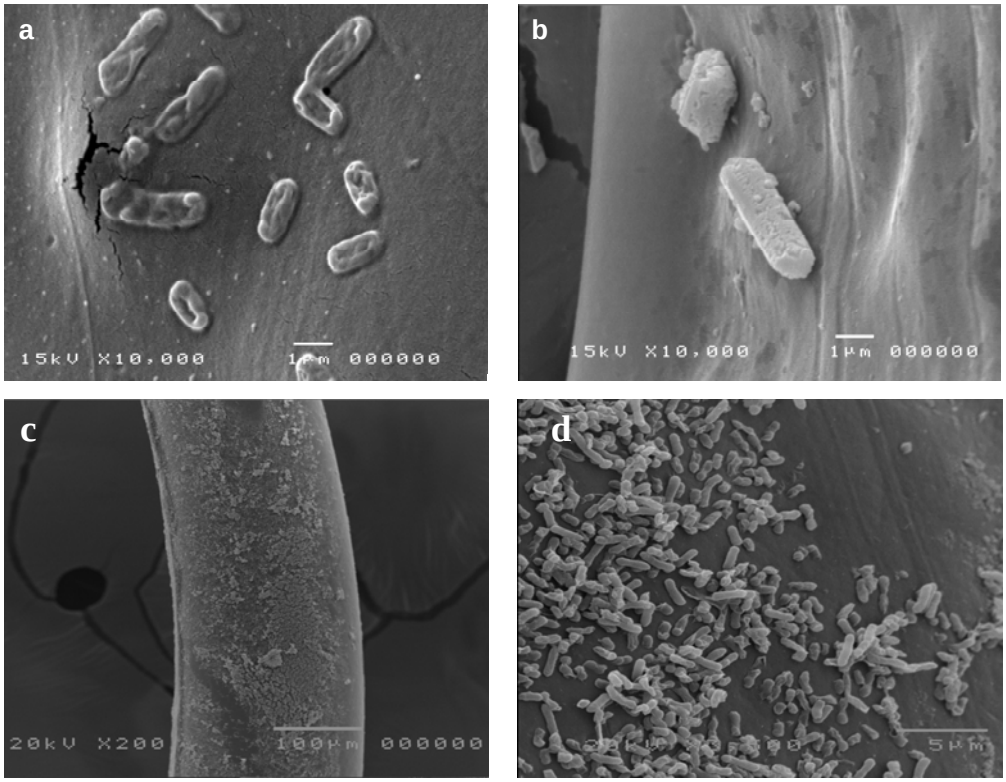

Figura 36. Visualização de bactérias *E. coli* ligadas à superfície da fibra por microscopia eletrônica de varredura a. a- grupos bacterianos na superfície da fibra. b- algumas bactérias isoladas também foram visualizadas ao longo da fibra. c- controle positivo, bactérias ligadas inespecificamente à fibra, d- detalhe de ampliação de área com camada de bactérias.

A formação de grupos de células na superfície das fibras é vista em outros estudos como no de GENG, MORGAN & ARUN (2004). Neste estudo, as imagens por microscopia eletrônica mostram que a superfície da fibra não foi totalmente coberta com bactérias, neste

caso *Listeria monocytogenes*. Estudos devem ser feitos para melhor avaliação deste efeito que pode estar relacionado ao material que compõe a fibra, no caso do PMMA, principalmente fluoretado, existe uma dificultado de espalhamento de substâncias em sua superfície, pois a energia de superfície necessária para ocasionar uma melhor adesão da substância é baixa neste material, levando à uma baixa tensão superficial (SABREEE, 2010).

5.8. Avaliação da atenuação de sinal por suspensões bacterianas

A sensibilidade do sensor foi verificada através da avaliação da atenuação do sinal, gerado após contato do sensor com suspensões bacterianas com concentrações de 10^4 e 10^3 células de *E. coli*/mL (Figura 37). Para o controle foi utilizada fibra tratada quimicamente mas sem anticorpo em contato com alta concentração bacteriana (10^8 células/mL).

Diferentemente do que ocorre com leituras de soluções homogêneas, como a solução de sacarose, a leitura da suspensão bacteriana não ocorre de forma linear, especialmente com baixas concentrações microbianas. Isto se deve a não absorção da maior parte da luz do campo evanescente, devido às poucas células na superfície da fibra, há a formação de um degrau de absorção, o mesmo foi verificado por RIJAL *et al,* 2005.

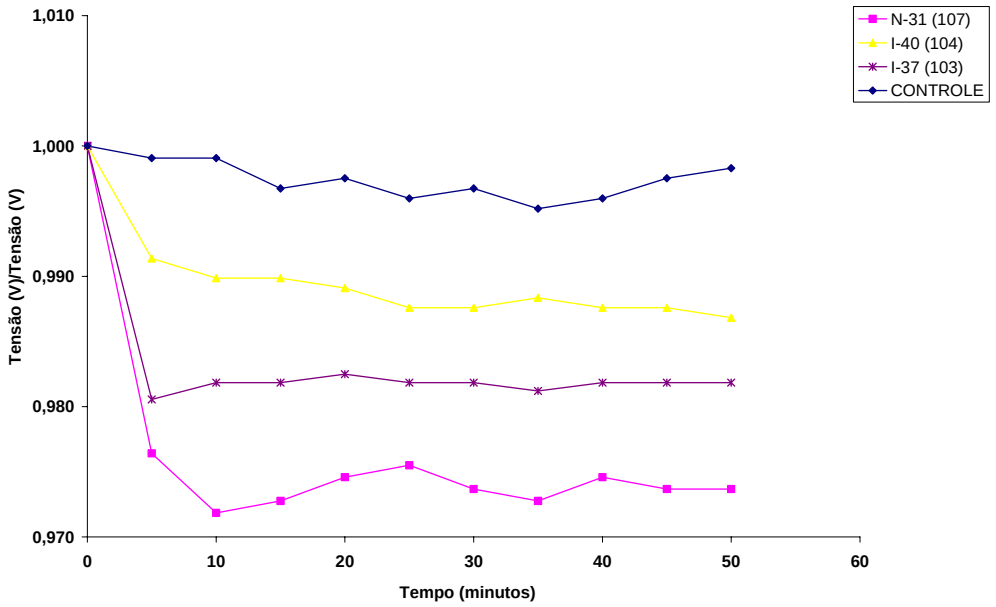

Figura 37. Determinação da sensibilidade do imunossensor frente às concentrações 10^4 e 10^3 células de *E. coli*/mL e o controle controle (fibra sem anticorpo em contato com alta concentração bacteriana, 10^8 células/mL).

5.8.1. Amplificação da atenuação de sinal

Devido ao baixo sinal obtido, quando foram utilizadas suspensões bacterianas nas concentrações de 10^3 e 10^4 células de *E. coli*/mL, partículas de látex (0,8 μm de diâmetro)

sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-*E. coli* foram empregadas. Neste caso, o controle utilizado foi uma fibra tratada quimicamente e com anticorpos ligados à sua superfície, porém sem contato com bactérias, incubada com a suspensão de partículas sensibilizadas (Figura 38).

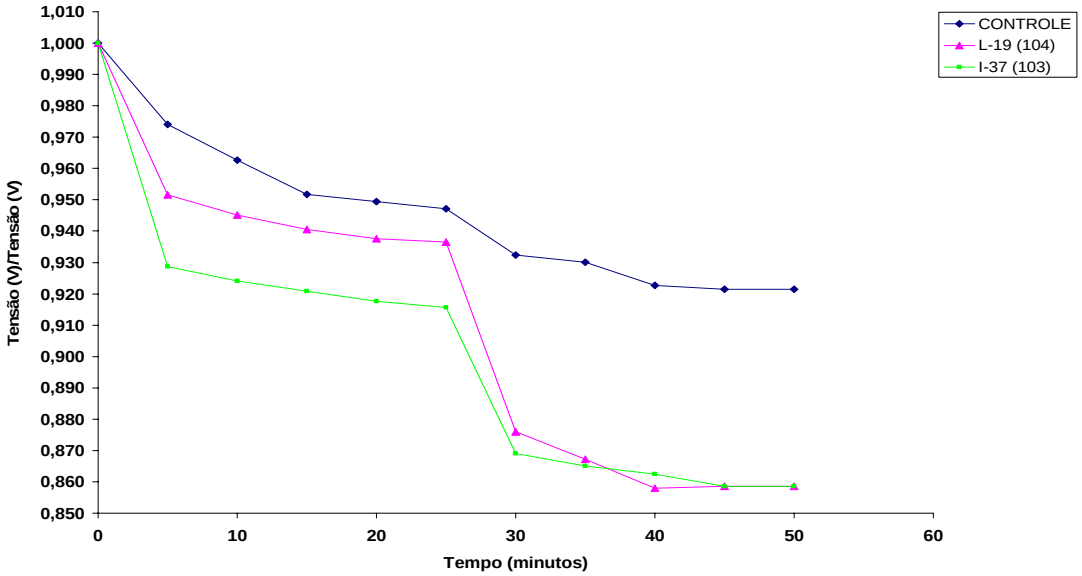

Figura 38. Amplificação do sinal através da utilização de partículas de látex. O controle utilizado foi uma fibra quimicamente tratada, porém sem anticorpos, incubada com a suspensão de partículas sensibilizadas.

5.9. Determinação do tempo de atividade dos anticorpos empregados

Após serem ligados às fibras os anticorpos tendem à degradação devido a possíveis variações do meio e a fatores que podem atuar junto a estas moléculas alterando sua conformação. Desta forma, foram feitos testes semanais para determinação da estabilidade dos anticorpos eleitos. O gráfico da Figura 39 mostra o decaimento da atividade dos anticorpos ao longo do tempo, indicando que a partir da quinta semana o sinal final obtido fica menor do que 0,020 V/V, próximo ao verificado nos controles negativos. A maior relação de tensão obtida na segunda semana em comparação com a primeira pode estar relacionada ao conjunto de fibras utilizado, assim como o comportamento demonstrado pelas fibras das leituras da quarta e quinta semanas, abaixo do ponto 1,0 da relação de tensão ao contrário das demais. Pequenas variações na geometia das fibras podem ser responsáveis por esta inversão, como visto por LEUNG *et al*.(2006).

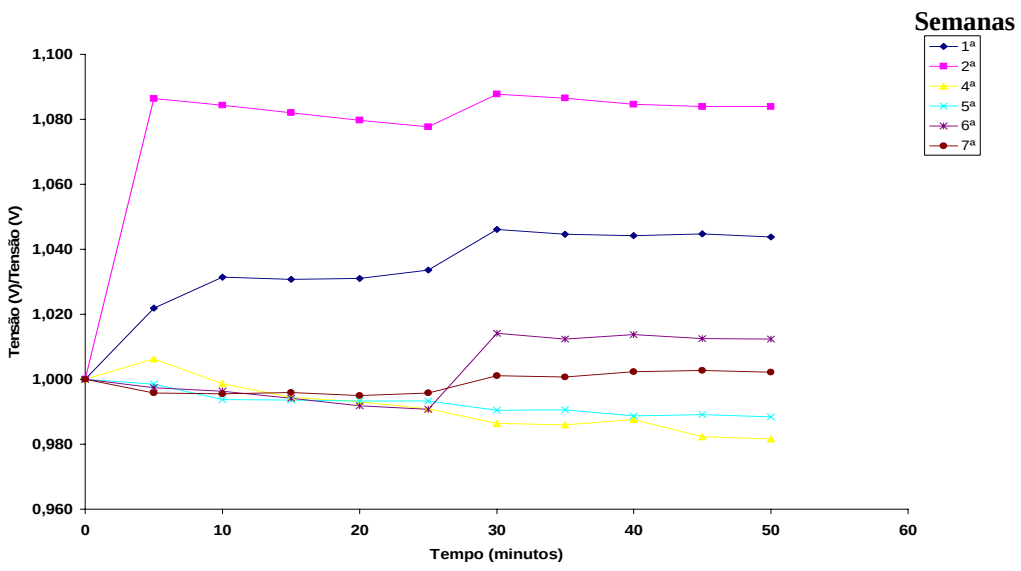

Figura 39. Determinação da atividade dos anticorpos ligados ao imunossensor ao longo das semanas.

5.10. Reaproveitamento de fibras com o religamento de anticorpos

A reutilização das fibras proporciona a diminuição dos custos do sensor, além de contribuir para um menor acúmulo de resíduos no ambiente. Desta forma, o desligamento dos anticorpos com soluções de glicina (0,1 M, pH 2,5), seguido de seu religamento, foi testado (Figura 40). Observa-se que após o terceiro religamento a sensibilidade de leitura cai drasticamente quando comparado a primeira leitura, atingindo valores próximo aos observados nos controles negativos, fibras sem anticorpos incubadas com suspensões bacterianas. Desta forma, a reutilização do imunossensor só poderia ocorrer uma vez.

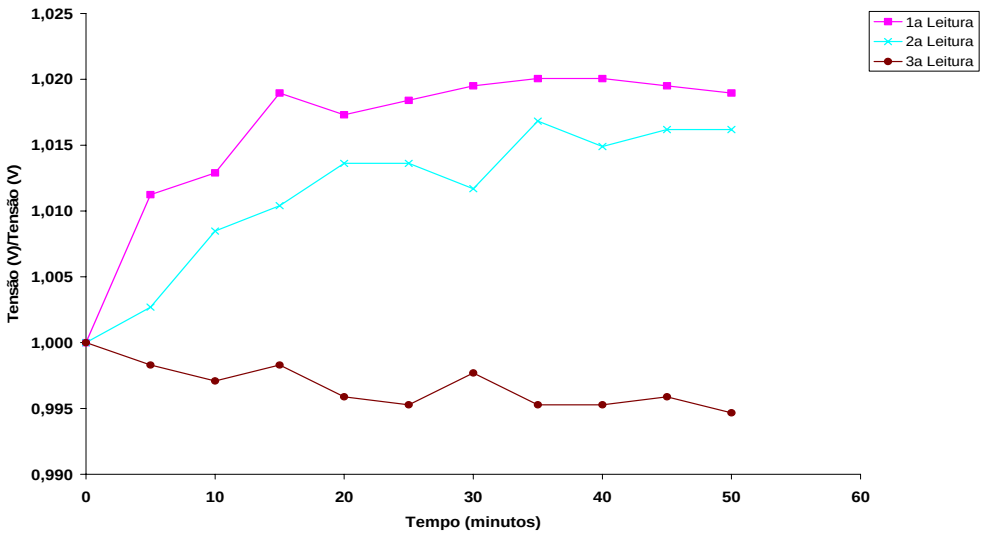

Figura 40. Reaproveitamento de fibras com a religação de anticorpos.

5.12. Avaliação da especificidade do sensor

A especificidade do imunossensor foi observada através de sua interação com outros gêneros bacterianos (*Klebsiella*, *Enterococcus* e *Citrobacter*). O imunossensor foi testado com suspensões de culturas puras (Figura 41) ou mistas (Figura 42), indicando que os sinais obtidos, quando da interação com outros gêneros bacterianos apenas, foram muito próximos aos obtidos com controles negativos, isto é, sem anticorpos, mas em contato com suspensão de *E. coli.* Isto ocorreu provavelmente devido a ligações celulares inespecíficas com os gêneros controle.

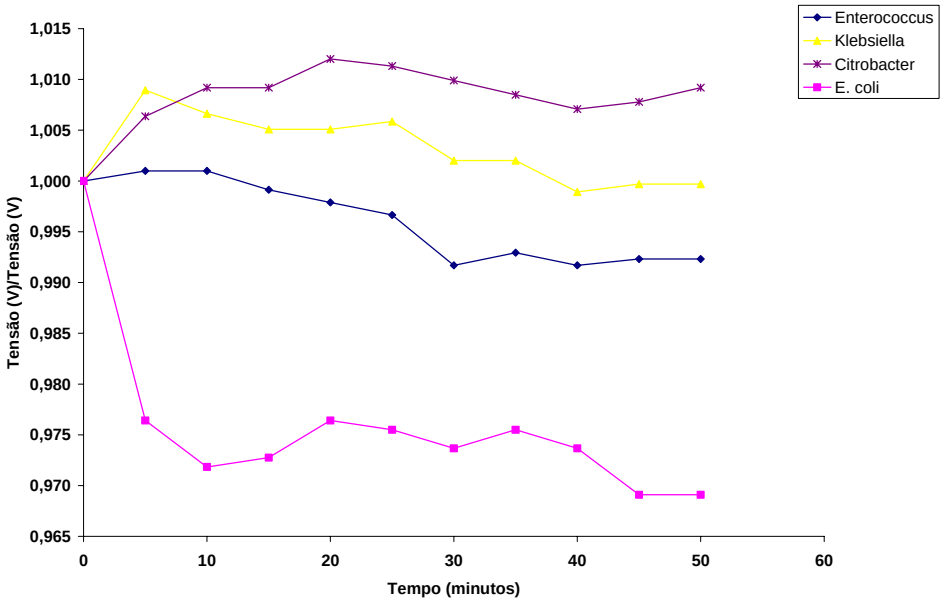

Figura 41. Avaliação da especificidade do sensor na presença de culturas bacterianas puras. Suspensões de 10^8 células/mL dos gêneros bacterianos *Klebsiella*, *Enterococcus* e *Citrobacter* foram incubadas com fibras previamente tratadas com anticorpos anti-*E.coli*.

Quando leituras de suspensões mistas foram realizadas, os sinais finais obtidos revelaram que suspensões de *E. coli* + *Enterococcus* e *E. coli* + *Citrobacter* proporcionaram sinais semelhantes aos detectados com suspensões apenas de *E. coli*, sugerindo que o diferencial nestes casos foi a cultura de *E. coli* utilizada. A suspensão mista *E. coli* + *Klebsiella*, apesar de haver sido observada uma menor diferença de tensão (V/V), houve um aumento visível quando comparado com a cultura pura (apenas *Klebsiella*). Nesta leitura de cultura mista pode ter ocorrido interferência da própria *Klebsiella*, dificultando a ligação da bactéria *E. coli* aos anticorpos. A inversão verificada neste caso, aumento ao invés da diminuição do sinal, pode estar associada a geometria da fibra, como observado por RIJAL *et al.* (2005). Neste mesmo estudo, quando duas cepas de *E. coli* foram submetidas ao

imunossensor avaliado pôde-se observar especificidade semelhante a observada na Figura 42, a adição de 50% da bactéria específica para o anticorpo levou ao aumento da resposta do sensor, neste caso com fibra de sílica.

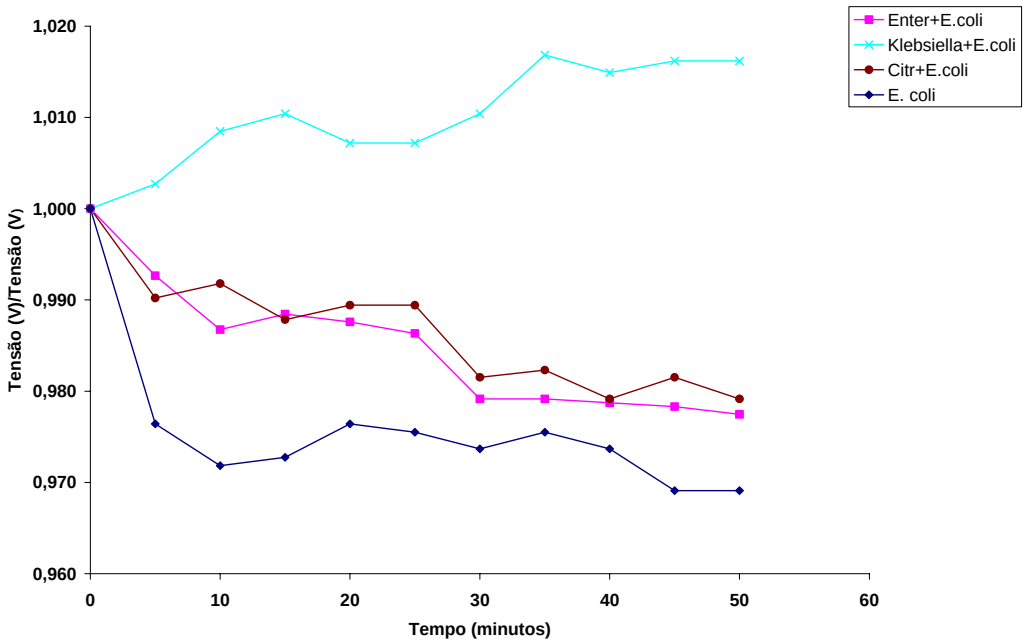

Figura 42. Avaliação da especificidade do sensor na presença de culturas bacterianas mistas. Suspensões mistas de 10^8 células/mL de *E. coli* + *Klebsiella, E. coli* + *Enterococcus, E. coli* + *Citrobacter* foram incubadas com fibras previamente tratadas com anticorpos anti-*E.coli*.

5.13. Avaliação de interferentes ambientais no processo de leitura

Devido a possíveis interferentes em amostras reais do meio foram realizados testes com a modificação de alguns fatores, comumente variáveis na natureza, para verificar se havia alguma alteração nas leituras.

A variação do fator dureza da água promoveu modificações nos sinais obtidos (Figura 43). Segundo o Ministério da Saúde (2006) pode-se classificar em mole ou branda a água que contém 4,29mg/mL de $CaCO_3$ e em dureza moderada a que contém 52,62 mg/mL, concentrações correspondentes as das amostras analisadas. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de $CaCO_3$ resultou na diminuição da sensibilidade de leitura do sensor (Figura 44), chegando a próximo de 0 quando da avaliação de água com dureza moderada. Este fato indicou que os sais presentes nas amostras foram capazes de influenciar na resposta do imunossensor, havendo possível necessidade de correção de dureza durante

análises de amostras ambientais. A presença dos sais, mais concentrados nos meios com maior dureza, pode ter prejudicado a ligação das bactérias aos anticorpos.

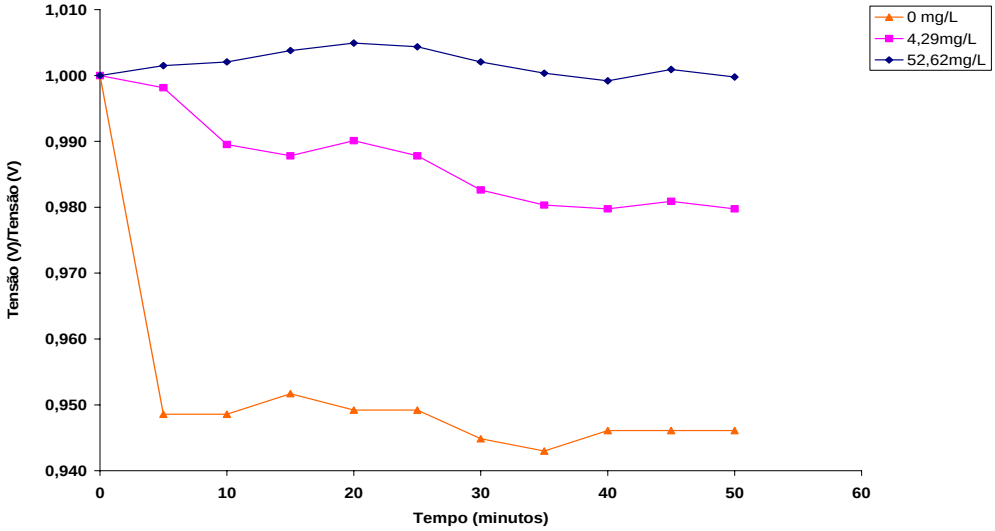

Figura 43. Avaliação do sensor frente a variações do fator dureza da água. Foi utilizada água destilada como controle negativo, leitura correspondente a 0 mg/ml.

O fator temperatura também influenciou nas leituras realizadas, sendo a temperatura ideal a normalmente utilizada (controle-30ºC), abaixo deste valor a sensibilidade do sensor foi menor (25º e 16ºC), como pode ser visto no Figura 44. Como o tempo de interação das bactérias com os anticorpos não é muito longo, apenas 1 hora, há a necessidade da utilização da temperatura ideal para que a ligação seja beneficiada. A exposição de sítios bacterianos devido ao aumento da temperatura também pode ser considerada.

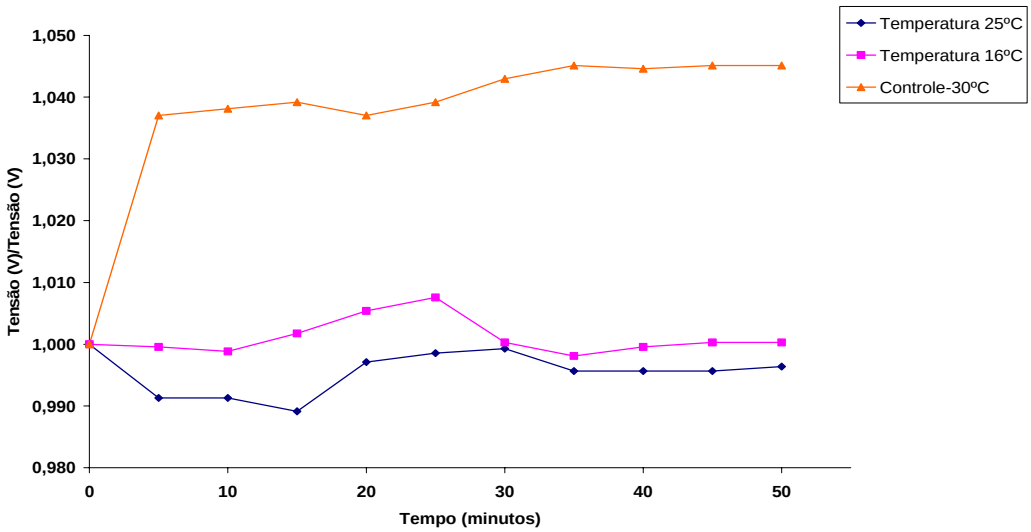

Figura 44. Avaliação do sensor frente a variações do fator temperatura (25ºC, 16ºC, 30ºC).

O pH também demonstrou influência na sensibilidade do sensor. Quando em valores de pH em torno de 7 (controle) foram observadas maiores diferenças de tensão (V/V) e ao se utilizar um pH ácido (5,0) pode-se observar uma redução na sensibilidade, mas ainda passível de ser lido como positivo. Porém, quando se adotou pH básico (8,0) a sensibilidade foi próxima a 0 (Figura 46). A utilização de pH ácido é normalmente atribuída a dissociação do complexo antígeno-anticorpo ou ao desligamento do anticorpo, mas a acidez é maior do que a apresentada, abaixo de 3 (RIJAL *et al*., 2005).

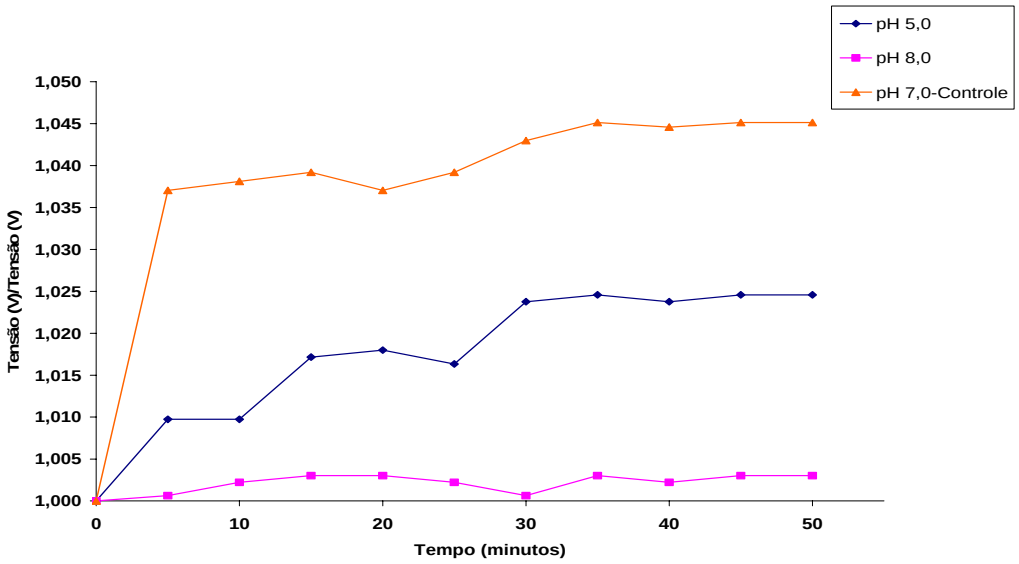

Figura 45. Avaliação do sensor frente a variações do fator pH (5,0, 7,0-controle- e 8,0)

Assim como sugerido por FIXE *et al,* as condições normalmente abordadas nos trabalhos que propõem detecções em ambientes aquosos utilizando sensores, indicam o emprego de condições ideais, como temperatura a 30ºC e pH neutro. Estes fatores, porém, assim como a dureza, quando alterados demonstraram influência na ligação e consequente detecção da bactéria *E. coli.*

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES

Devido às suas características como sensibilidade, especificidade e rápido fornecimento de resultados, os imunossensores tem sido bastante estudados, com objetivos de análises, principalmente nas áreas de saúde, de alimentos e ambiental. A partir dos resultados obtidos durante este trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões descritas a seguir:

1. O material escolhido para a construção do imunossensor, fibra óptica plástica de PMMA, mostrou-se adequado, pois é de fácil e segura manipulação.

2. A máquina de estiramento foi capaz de produzir "tapers" com mesmas medidas, porém alguns ajustes devem ser feitos para que a repetibilidade seja aumentada.

3. Variações nas medidas das fibras promoveram diferentes leituras, indicando que a geometria é um fator de grande influencia e deve ser considerado na elaboração de sensores a fibra óptica.

4. As fibras dobradas apresentaram-se mais estáveis a variações de diâmetro e comprimento do "taper", mais sensíveis aos diferentes índices de refração analisados, além de serem de mais fácil manuseio e transporte.

5. Não foi possível determinar se houve perda da casca ou apenas seu estiramento, outras técnicas devem ser empregadas para a verificação deste ponto.

6. Através da microscopia eletrônica de varredura não foi possível notar modificações significativas na superfície das fibras após aquecimento e dobra. A microscopia de força atômica permitiu uma análise mais detalhada e revelou que a fibra tornou-se menos homogênea com o aquecimento.

7. O procedimento de ligação dos anticorpos à fibra mostrou-se eficiente e possibilitou fibras revestidas especificamente com as células alvo, mesmo quando desafiados com bactérias da mesma família da bactéria *E. coli.*

8. Os anticorpos apresentaram queda de atividade ao longo das semanas, ficando viáveis, após ligação à superfície das fibras, por até quatro semanas, quando estocados a 4º C.

9. O sensor foi capaz de detectar a presença da bactéria *E. coli* em baixas concentrações (10^4 e 10^3 células/mL) quando o sinal foi amplificado, no caso, com a utilização de partículas de látex, adsorvidas de anticorpos anti-*E. coli*.

10. Foi possível realizar a reutilização das fibras, com religação dos anticorpos, por duas vezes, sendo assim, as fibras só podem ser reaproveitadas uma vez.

11. A diminuição de sensibilidade do imunossensor frente à modificação dos fatores ambientais temperatura, pH e dureza, pode requer um ajuste da amostra para que a detecção não seja comprometida. Novos testes, com mais amostras, devem ser feitos.

12. Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que abrem oportunidade para a realização de pesquisas que levem à amplificação do sinal, portanto uma detecção mais apurada da bactéria *E. coli*, assim como a detecção de outras bactérias em meio líquido.

13. O sistema, assim, demonstrou-se aplicável, atingindo os objetivos aos quais se propôs. Novos testes devem permitir seu aperfeiçoamento, culminando na obtenção de um imunossensor de amplo interesse ambiental, industrial ou clínico.

CAPÍTULO 7. SUGESTÕES

Segundo os resultados obtidos pode-se indicar algumas alternativas e aprimoramentos para a obtenção de melhores resultados:

- Visando atenuar as variações na geometria das fibras, através da diminuição das trocas de calor com o ambiente externo ao sistema de estiramento, a resistência pode ser acondicionada em um compartimento isolador;

- Aperfeiçoamento do sistema de leitura com um melhor acoplamento das fibras aos conectores, possibilitando menor perda de luz;

- A amplificação do sinal pode ser realizada com o emprego de anticorpos marcados com fluoróforos ou cromóforos, aumentando a sensibilidade do sistema e permitindo sua utilização em análises clínicas;

- Avaliação de alterações nas leituras relacionadas ao aumento do teor salino e protéico, possibilitando posteriores análises de amostras de água salgada, salobra e originadas de esgotos;

- O imunossensor desenvolvido pode ser adaptado para a detecção de outros microrganismos que apresentem maior dimensão (fungos, protozoários e algas) e para a avaliação de amostras ambientais, através da utilização de anticorpos específicos;

.