



IMUNOSSENSOR OPTOELETRÔNICO PARA DETECÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* NA ÁGUA

Domingos Marcelus Carias Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Orientadores: Marcelo Martins Werneck

Regina Célia da Silva Barros

Allil

Rio de Janeiro

Outubro de 2017

IMUNOSSENSOR OPTOELETRÔNICO PARA DETECÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* NA ÁGUA

Domingos Marcelus Carias Rodrigues

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

Examinada por:

Prof. Marcelo Martins Werneck, Ph. D.

Prof.^a Regina Célia da Silva Barros Allil, D. Sc.

Prof. Antonio Petraglia, Ph. D.

Prof. Marco Antônio Lemos Miguel, D. Sc.

Prof. Marcos Antonio Ruggieri Franco, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2017

Rodrigues, Domingos Marcelus Carias

Imunossensor Optoeletrônico para Detecção de Contaminação de *Escherichia coli* na Água/ Domingos Marcelus Carias Rodrigues. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XXIII, 134 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Marcelo Martins Werneck

Regina Célia da Silva Barros Allil

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Elétrica, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 112-119.

1. Sensores a Fibra Óptica. 2. Imunossensor. 3. Índice de Refração. I. Werneck, Marcelo Martins *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Elétrica. III. Título.

*“Grandes são as obras do SENHOR,
dignas de estudo para quem as ama.”*

Salmo 111: 2

Dedicatória

Dedico esta Tese a minha amada esposa Vanise Ribeiro da Silva Rodrigues, pelo amor, dedicação e companheirismo, ajudando-me a perseverar nos dias difíceis, e a minha querida filha Rebeca Ribeiro da Silva Rodrigues, pelo sorriso que me motivava a continuar e que faz a caminhada mais prazerosa. Eu não teria chegado até aqui sem vocês.

Agradecimentos

Ao meu Senhor Eterno, Cristo Jesus, razão da minha existência, por me capacitar e revelar o prazer da ciência sem abdicar da fé.

A minha família, pais (Erinete Carias e Elson Rodrigues), irmãos, avô, tios, primos, agregados, enfim, estes que me conhecem de perto e sempre torcem por mim.

Ao meu orientador, professor Marcelo Martins Werneck, pessoa que aprendi a admirar e respeitar pelo amor e dedicação ao trabalho e capacidade de elaborar coisas novas. Obrigado pela oportunidade e por acreditar em mim.

A minha orientadora, professora Regina Célia da Silva Barros Allil, pelo incentivo na caminhada e preocupação constante em enriquecer o trabalho realizado.

A todos os amigos que ganhei no LIF ao longo desses seis anos: Fábio Nazaré, Bessie, Eduardo, Gisele, Fernando, Daniel, Sidney, Roberto, Júlio, Sebastião, Viviane, Izabel, José Luiz, Cesar, Marco Miguel, Thiago, Thiago Bitarelli, Marcos, Hugo, Marcell, Rodrigo, Fábio Ouverney, Rafael, Diego, Dulce, Deusa, Alfredo, Bruno, Vanessa, Glaice, Roberto, Alexandre, Artur, Catalani, Marcio, Pedro, Leandro, Igor, Gustavo, Meisan, Bieler, Nathália, Larissa, Dante, Fábio Dutra, Ariadny e Rafaela que me ajudou na parte microbiológica dos experimentos. Muito obrigado! Espero não ter esquecido ninguém, pois acredito que grande parte do conhecimento apresentado aqui foi construído na convivência com vocês.

Ao professor Marcos Antonio Ruggieri Franco, que neste último ano foi praticamente um co-orientador, ajudando-me no desafio de aprender modelagem computacional.

Aos amigos e irmãos na fé em Cristo, por me incentivarem ao crescimento intelectual e demonstrarem amor e cuidado em muitos momentos cruciais, sustentando-me com palavras e orações. Em especial aos pastores Felipe, Salvador, João Carlos e suas famílias. Vocês são amigos mais chegados que irmãos.

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

IMUNOSSENSOR OPTOELETRÔNICO PARA DETECÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* NA ÁGUA

Domingos Marcelus Carias Rodrigues

Outubro/2017

Orientadores: Marcelo Martins Werneck

Regina Célia da Silva Barros Allil

Programa: Engenharia Elétrica

O presente trabalho propõe o estudo e o desenvolvimento de imunossensores a fibra óptica plástica (POF) para identificação de água contaminada em menos de uma hora. Baseados na reação imunológica, a POF é funcionalizada com um anticorpo para capturar bactérias e identificar concentrações da *Escherichia coli* em água.

O princípio físico fundamental para a construção do imunossensor é a variação dos modos de luz guiados quando a fibra é dobrada. Na curva da fibra alguns modos escapam em função do índice de refração do meio externo à fibra. Desta forma, a variação do índice de refração externo provoca a variação da potência óptica transmitida. O acúmulo das bactérias nesta região sensora da POF provoca esta variação, identificando-se assim concentrações mínimas da *E. coli* na água.

Um setup optoeletrônico utilizando uma plataforma Arduino foi desenvolvido para fornecer e interpretar os sinais elétricos e ópticos do sistema. A modelagem computacional foi utilizada para otimizar o imunossensor e propor avanços para pesquisas futuras.

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

OPTOELECTRONIC IMUNOSENSOR FOR DETECTING OF *ESCHERICHIA COLI*
CONTAMINATION IN WATER

Domingos Marcelus Carias Rodrigues

October/2017

Advisors: Marcelo Martins Werneck

Regina Célia da Silva Barros Allil

Department: Electrical Engineering

This work proposes the study and development of plastic optical fiber (POF) immunosensors for contaminated water identification in less than an hour. Based on the immune response, the POF is functionalized with an antibody to capture bacteria and identify *Escherichia coli* concentrations in water.

The physical principle fundamental for the immunosensor construction is the variation of light modes guided when the fiber is bent. In the bent fiber some modes escape, according to the refractive index of the external medium of the fiber. Thus, the variation of the external refractive index causes the transmitted optical power changes. The accumulation of bacteria in the POF sensing region causes this variation too, identifying *E. coli* concentrations in the water.

An optoelectronic setup using an Arduino platform is developed to provide and interpret the electrical and optical signals involved in this system. Computational modeling was used for optimizing the immunosensor and proposing advances for future researches.

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xviii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xix
Lista de Símbolos	xxii
Capítulo 1 Introdução	1
1.1 Motivação e importância do tema	1
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo geral	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3 Organização do trabalho	4
Capítulo 2 Revisão bibliográfica	6
2.1 Métodos de detecção de micro-organismos	6
2.1.1 Métodos convencionais	6
2.1.2 Métodos rápidos	7
2.2 Biossensores	8
2.3 Funcionalização do PMMA nos imunossensores.....	13
2.3.1 Método utilizando fragmentos Fab'	13
2.3.2 Método LbL.....	15
2.3.3 Método com nanofibras carregadas.....	17
2.3.4 Comparação entre os métodos PEI, HMD e adsorção passiva.....	19
2.3.5 Método de funcionalização para imobilização de DNA.....	20
Capítulo 3 Fundamentação teórica do sensor óptico	23
3.1 Características da fibra curvada.....	23
3.2 Característica da potência de saída com a variação do índice de refração do meio externo	27
3.3 Sensores à fibra óptica para refratometria	30
3.4 A morfologia da Escherichia coli e o imunossensor	32
Capítulo 4 Metodologia e montagem experimental.....	34
4.1 Protocolo de remoção da casca da POF.....	34
4.2 Fabricação dos sensores POF	34
4.3 A configuração eletrônica utilizando o Amplificador Lock-in	38
4.4 As configurações eletrônicas desenvolvidas para a plataforma Arduino	40
4.5 Metodologia de análise da incerteza da medição e sensibilidade.....	46
4.6 Protocolos químico e biológico utilizados na funcionalização e imobilização do imunossensor	46
Capítulo 5 Modelagem computacional do sensor	50

5.1	O BeamPROP™ e a modelagem óptica utilizando o método BPM.....	50
5.2	A construção dos Modelos no BeamPROP™	52
5.3	Resultados e discussão da simulação da medida do índice de refração	55
5.4	Resultados e discussão da simulação do imunossensor	60
5.4.1	Simulação das bactérias pela variação do índice de refração e espessura da camada	60
5.4.2	Simulação das bactérias pela variação da densidade linear.....	65
Capítulo 6	Resultados e discussão da medida de índice de refração	68
6.1	Comparação entre os sistemas com a plataforma Arduino e o Amplificador Lock-in	68
6.2	Avaliação da influência da hidratação do sensor.....	71
6.3	Comportamento do sensor em índices de refração próximo ao da água pura	73
6.4	Comparação entre os resultados experimentais e as simulações.....	76
Capítulo 7	Resultados e discussão do imunossensor	82
7.1	Análises preliminares do imunossensor	82
7.1.1	Análise microscópica da presença do anticorpo.....	82
7.1.2	Análise microscópica da presença da E. coli.....	85
7.1.3	Análise das propriedades da POF por espectroscopia de infravermelho..	88
7.2	Ensaio com imunossensores	91
7.2.1	Resultados do imunossensor com o sistema com Amplificador Lock-in.	91
7.2.2	Resultados do imunossensor com a plataforma Arduino e o protocolo 1	92
7.2.3	Resultados do imunossensor com a plataforma Arduino e o protocolo 2	96
7.3	Comparação entre os resultados experimentais e as simulações do imunossensor	98
Capítulo 8	Modelagem de diferentes formas do sensor	102
Capítulo 9	Conclusões e trabalhos futuros.....	110
Capítulo 10	Referências bibliográficas	112
Anexo A	120
Anexo B	132

Lista de Figuras

Figura 2.1: Esquema de estrutura básica do anticorpo IgG, onde V são as regiões variáveis e C as regiões contantes, nas porções variável (Fab) e cristalizável (Fc). No detalhe é mostrada a região de ligação com o antígeno [30].	11
Figura 2.2: Ligação dos anticorpos à superfície da fibra. (a) Anticorpos ligados à fibra sem a utilização da proteína A como imobilizante. (b) Anticorpos ligados corretamente à fibra devido à utilização de proteína A. Figura adaptada de [9].	12
Figura 2.3: Modelo de anticorpo completo e cortado em partes $F(ab)_2$, Fab' e Fab. Figura adaptada de [34].	14
Figura 2.4: a) Representação do processo de imobilização das cadeias Fab-H e Fab-L sendo realizadas simultaneamente; b) representação do processo de imobilização de forma sequencial das cadeias Fab-L e Fab-H [34].	15
Figura 2.5: (a) Processo de formação do filme LbL. (b) Ligação do anticorpo ao filme LbL. Figura Adaptada de [36].	16
Figura 2.6: a) Variação da intensidade da fluorescência com o tempo. b) Calibração do imunossensor comparado com o método ELISA. Figura adaptada de [36].	17
Figura 2.7: Esquema da captura da E. coli pelas nanofibras carregadas. (a) Nanofibras positivas atraem as células E. coli negativa. (b) Nanofibras negativas repelem as células E. coli negativa. (c) Nanofibras negativas com anticorpo Anti-E. coli atraem as células. Figura adaptada de [37].	18
Figura 2.8: Análise da eficiência da captura das células de E. coli pelas nanofibras. Figura adaptada de [37].	18
Figura 2.9: Comparação dos resultados entre as técnicas de imobilização PEI, HMD e adsorção passiva. Figura adaptada de [40].	20
Figura 2.10: (a) Tratamento químico utilizado para aaminação do PMMA proposto pelo artigo [33]. (b) Tratamento químico utilizado para comparação do processo de aaminação do PMMA [41]. (c) Tratamento com glutaraldeído para fixação do DNA. Figura adaptada de [33].	21
Figura 3.1: Fibra em curva com variação do ângulo (ϕ). ρ – raio do núcleo; n_1 – índice de refração da fibra; n_2 – índice de refração do meio externo; R – raio da curva; r – distância entre o centro da curva e a luz guiada; z_p – distância de meio período entre sucessivas reflexões na fibra esticada [11].	25

Figura 3.2: Destaque para os ângulos de reflexão dentro da fibra curvada. (i) reflexões alternando entre as superfícies externa e interna; (ii) reflexões na superfície externa; ϕ_P – ângulo entre duas reflexões consecutivas na superfície externa; θ_ϕ – ângulo de reflexão na superfície externa; θ'_ϕ – ângulo de reflexão alternando entre as superfícies interna e externa; z – direção de propagação da luz. n_1 – índice de refração interno; n_2 – índice de refração externo. Figura adaptada de [43]	26
Figura 3.3: Característica de potência de saída normalizada com a variação do índice de refração do meio externo com a fibra dobrada com ângulo fixo de 180°	30
Figura 4.1: (a) POF descascada; (b) Ampliação da área descascada. Observa-se parte da casca solta na interface da região com casca/sem casca.....	34
Figura 4.2: (a) Equipamento desenvolvido para produzir sensores em forma de U. (b) Ampliação da área onde os sensores são curvados. (c) Sensor fabricado em forma de U. Figura adaptada de [2].	35
Figura 4.3: (a) Suporte simples para o LED, fotodiodo e sensor. (b) Suportes duplo para dois LEDs, dois fotodiodos e parafusos de fixação para dois sensores. (c) vista do suporte duplo com sensores. (d) placa com LEDs e fotodiodos.....	36
Figura 4.4: (a) gráfico da intensidade espectral relativa emitida pelo LED (I_{rel}) por comprimento de onda (λ) [57]. (b) gráfico da sensibilidade espectral relativa do fotodiodo (S_{rel}) em função do comprimento de onda (λ) [58].....	37
Figura 4.5: (a) Fabricação do sensor com fibra de $250\ \mu\text{m}$. (b) Ampliação da imagem do sensor sendo moldado pelo parafuso. (c) Sensor com fibra de $250\ \mu\text{m}$, fixado ao suporte com o auxílio de agulhas.	38
Figura 4.6: Diagrama de blocos do experimento realizado para medição do índice de refração com os sensores a fibra óptica utilizando o Amplificador Lock-in [11].	39
Figura 4.7: Diagrama de blocos do setup implementado inicialmente com a plataforma Arduino.....	40
Figura 4.8: Circuito de entrada para o conversor A/D (condicionador de sinal). e a saída do conversor D/A com PWM (driver).	41
Figura 4.9: Diagrama de blocos do setup implementado com sensor de referência.	42
Figura 4.10: Circuito de condicionamento do sinal e drivers para a plataforma Arduino	42
Figura 4.11: Tela apresentada pela interface da plataforma Arduino.....	43
Figura 4.12: Sistema de medição com a plataforma Arduino em funcionamento.	44
Figura 4.13: Fluxograma do processo de calibração e medição com o sistema.	45

Figura 4.14: Fluxograma do protocolo biológico utilizado na funcionalização do sensor.	48
Figura 4.15: Processo de diluição das concentrações de E. coli	49
Figura 5.1: Guia de onda retangular.	51
Figura 5.2: Interface de programação do BeamPROP™. Em destaque a representação das bactérias como faixa contínua (azul).....	52
Figura 5.3: Interface do BeamPROP™ em funcionamento.	53
Figura 5.4: Ilustração do modelo implementado no BeamPROP™ representando a presença de bactérias (a) cobrindo toda a curva do sensor. (b) apenas a metade da curva mais próxima à entrada da luz. (c) apenas a metade mais próxima à saída da luz. (d) apenas o centro da curva da fibra.	54
Figura 5.5: Interface de programação do BeamPROP™. Em destaque a representação das bactérias como medidas de 1,0 x 2,0 µm (azul) e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente.	55
Figura 5.6: Resultado da simulação da fibra óptica de 980 µm de diâmetro. A potência de saída varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm.	56
Figura 5.7: Resultado da simulação da fibra óptica de 980 µm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. São apresentadas as equações das sensibilidades para os raios de 4,0 mm e 5,0 mm.	57
Figura 5.8: Resultado da simulação da fibra óptica de 750 µm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. A equação da reta de maior sensibilidade é apresentada.	58
Figura 5.9: Resultado da simulação da fibra óptica de 500 µm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. A equação da reta de maior sensibilidade é apresentada.	58
Figura 5.10: Resultado da simulação da fibra óptica de 250 µm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U	

com raios de curvatura entre 0,5 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. A equação da reta de maior sensibilidade é apresentada..... 59

Figura 5.11: Modelo implementado no BeamPROPTM: (a) simulação interrompida, mostrando regiões da POF de 980 μm com raio de curvatura de 4,0 mm (amarelo), região com E. coli com 100 μm de espessura para facilitar a visualização (azul) e região com amostra de E. coli em água (vermelho); (b) simulação de E. coli com 2,0 μm de espessura e índice de refração de $n = 1,39$, onde aparece um padrão de interferência. . 61

Figura 5.12: Raio luminoso propagado na POF curvada: (a) primeira situação, quando o raio encontra a interface POF/bactérias, sendo N_0 , N_1 as retas normais às superfícies da POF e C_2 , respectivamente, n_b é o índice de refração médio na camada de bactérias C_1 , $n_{\text{água}}$ o índice de refração da água, e θ_0 e θ_1 os ângulos de incidência na superfície da POF e da camada C_1 , respectivamente. (b) segunda situação, quando o raio encontra a interface bactéria/bactéria com espessura maior, onde θ_2 é o ângulo de incidência na camada C_2 e N_2 é a reta normal a esta superfície. 62

Figura 5.13: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável em toda a fibra. 63

Figura 5.14: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na metade inicial da curva fibra. 63

Figura 5.15: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na metade final da curva da fibra. 64

Figura 5.16: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na metade central da curva da fibra. 64

Figura 5.17: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável em toda a curva da fibra de 250 μm de espessura com raio da curva de 1,5 mm. 65

Figura 5.18: Potência de saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de 1,0 x 2,0 μm e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U com POF de 980 μm com raio de curvatura de 4,0 mm. 66

Figura 5.19: Potência de saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de 1,0 x 2,0 μm e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U com POF de 250 μm com raio de curvatura de 1,5 mm. 67

Figura 6.1: Tensão em função do índice de refração no sensor U.....	69
Figura 6.2: Comparação entre o sistema com o Amplificador Lock-in e com a plataforma com o microcontrolador Arduino.....	70
Figura 6.3: Tensão em função do índice de refração no sensor U antes da hidratação..	71
Figura 6.4: Tensões em função do índice de refração no sensor U após uma semana imerso em água.....	72
Figura 6.5: Comparação da sensibilidade normalizada do Sensor U antes e depois de hidratado.....	73
Figura 6.6: Resultado do experimento para calibração das concentrações de sacarose de 3 % a 15 %.....	74
Figura 6.7: Comportamento do sensor avaliando índices de refração próximos ao da água pura.....	76
Figura 6.8: Tensão de saída em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 5,0 mm na fibra de 980 μm descascada.....	77
Figura 6.9: Tensão de saída normalizada em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 5,0 mm na fibra de 980 μm	77
Figura 6.10: Tensão de saída em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 4,0 mm na fibra de 250 μm descascada.....	78
Figura 6.11: Tensão de saída normalizada em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 4,0 mm na fibra de 250 μm	78
Figura 6.12: Tensão de saída em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 1,5 mm na fibra de 250 μm	79
Figura 6.13: Tensão de saída normalizada em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 1,5 mm na fibra de 250 μm	79
Figura 6.14: Comparação entre o experimento e a simulação dos sensores em forma de U com fibra de 980 μm descascada, com raios de 4,0 mm e 5,0 mm.....	80
Figura 6.15: Comparação entre o experimento real e a simulação dos sensores em forma de U com fibra de 250 μm , com raios de 1,5 mm e 4,0 mm.....	81
Figura 7.1: Microscopia confocal das fibras descasca e com casca.....	83
Figura 7.2: Histograma da microscopia utilizando o confocal. (a) Fibra com casca; (b) Fibra descascada.....	84
Figura 7.3: Microscopia eletrônica de varredura do imunossensor descascado após capturar bactérias por 40 minutos. Imagens calibradas em: (a) 2,0 mm; (b) 300 μm ; (c) 50 μm e (d) 20 μm	87

Figura 7.4: Microscopia eletrônica de varredura do imunossensor sem casca após capturar bactérias por 40 minutos. Imagens calibradas em: (a) 2,0 mm. (b) 100 μm . (c) 20 μm . (d) 5 μm .	88
Figura 7.5: Espectroscopia de infravermelho da POF de 980 μm , realizada nas etapas de PMMA puro, e funcionalizada com HMDA e Glutaraldeído.	89
Figura 7.6: Espectroscopia de infravermelho da POF de 980 μm , realizada nas etapas de PMMA puro, e funcionalizada com HMDA, Glutaraldeído e imobilizada com o anticorpo. Logo após a fibra foi imersa por 40 minutos em suspensão de E. coli com concentração de 10^8 UFC/ml.	90
Figura 7.7: Espectroscopia de infravermelho da fibra de 980 μm e de 250 μm para identificação das características da sua superfície.	91
Figura 7.8: Resultados dos experimentos com Escherichia coli O55 para concentrações de 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC/ml e solução salina como controle negativo, utilizando o amplificador Lock-in. POF de 1000 μm com raio de curvatura de 4,0 mm. Figura adaptada de [2].	92
Figura 7.9: Detecção de bactéria em água com 10^4 UFC/ml utilizando sensor U com casca e o sistema com sensor de referência.	93
Figura 7.10: Detecção de bactéria em água com 10^6 UFC/ml utilizando sensor U com casca e o sistema com sensor de referência. Experimentos realizados na estufa com temperatura de 26 °C e umidade de 40 %.	94
Figura 7.11: Detecção de bactéria em água com 10^4 UFC/ml utilizando sensor U descascado e o sistema com sensor de referência.	95
Figura 7.12: Reconhecimento de bactéria em água com 10^4 UFC/ml utilizando sensor U sem casca e o sistema com sensor de referência. Experimentos realizados na estufa com temperatura entre 25°C e 26 °C e umidade entre 42% e 44%.	96
Figura 7.13: Imunossensores funcionalizados com o protocolo biológico 2 para a detecção de E. coli em concentração 10^8 UFC/ml.	97
Figura 7.14: Imunossensores confeccionados com fibra de 250 μm descascada e raio de curvatura de 1,5 mm, funcionalizados com o protocolo biológico 2 para a detecção de E. coli em concentração 10^8 UFC/ml.	98
Figura 7.15: Resultado experimental do imunossensor 3 feito com POF de 980 μm de diâmetro e funcionalizado com o protocolo biológico 2.	99

Figura 7.16: Potência de Saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias de 0,01 entre os valores de 0 a 0,05, e com variação de 0,05 entre os valores de 0,05 a 0,30, distribuídos aleatoriamente sobre o sensor U com POF de 980 μm	100
Figura 7.17: Comparação entre os resultados experimentais do sensor 3 feito com POF de 980 μm e da simulação do sensor U com o mesmo diâmetro e raio de curvatura da POF.....	100
Figura 8.1: Modelos dos sensores: (a) U (b) Espiral (c) Zigue-zague implementados para simulação	102
Figura 8.2: Interface de programação do BeamPROP™ preparada para simulação do Sensor Zigue-zague. Em amarelo a POF e em vermelho o meio externo. A faixa amarela central foi configurada com raio de curvatura negativo.	103
Figura 8.3: Resultados da simulação do processo de calibração do sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de 980 μm	104
Figura 8.4: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Espiral com POF de 980 μm	104
Figura 8.5: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Zigue-zague com POF de 980 μm	105
Figura 8.6: Simulação do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de 1,0 x 2,0 μm e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de 980 μm	106
Figura 8.7: Resultados da simulação do processo de calibração do sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de 250 μm	107
Figura 8.8: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Espiral com POF de 250 μm	107
Figura 8.9: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Zigue-zague com POF de 250 μm	108
Figura 8.10: Potência de Saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de 1,0 x 2,0 μm e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de 250 μm	108

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Quantificação dos grupos aminas no PMMA quimicamente modificado. Adaptada de [33].	22
Tabela 5.1: Sensibilidades (dP/dn)	60
Tabela 6.1: Tensões de saída medidas pelo sistema com a plataforma Arduino.	68
Tabela 6.2: Índices de refração medidos com o Amplificador Lock-in e com a plataforma Arduino.....	70
Tabela 6.3: Incerteza das medidas em Índice de Refração do Sensor U	72
Tabela 6.4: Índices de Refração medidos pelo refratômetro Abbe.	74
Tabela 6.5: Tensões de saída medidas com o sensor U.....	75
Tabela 6.6: Incerteza da medida para tensão e índice de refração medidos com o sensor U.	76
Tabela 6.7: Comparação das sensibilidades das simulações com os resultados experimentais.....	81
Tabela 8.1: Atenuações percentuais na saída normalizada dos sensores com POF de 980 μm e 250 μm	109

Lista de Abreviaturas e Siglas

A/D – Conversor Analógico-Digital

AC – *Alternating Current* (Corrente Alternada)

Ac – Anticorpos

Ag – Antígenos

Arduino – *Open-source electronics platform based on easy-to-use hardware and software* (Plataforma eletrônica de fonte aberta baseada em hardware e software fáceis de usar)

AWG – *Arrayed waveguide gratings* (Roteadores de Rede de Guias)

BPM – *Beam Propagation Method* (Método de Propagação de Feixe)

BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina de Soro Bovino)

CENABIO – Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem

COPPE – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia

CPD – *Critical Point Dryer* (Ponto Crítico)

DC – *Direct Current* (Corrente Contínua)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dp - distância de penetração

EDC – *N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimide hydrochloride* (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

Fab – *Fragment antigen-binding* (Fragmento de união ao antígeno)

Fab-H – *Fragment antigen-binding - Heavy* (Fragmento de união ao antígeno pela cadeia pesada)

Fab-L – *Fragment antigen-binding - Light* (Fragmento de união ao antígeno pela cadeia leve)

Fc – *Fragment crystallizable* (Fragmento cristalizável)

FISH – *Fluorescence in situ hybridization* (hibridização fluorescente in situ)

FRET – *Fluorescence resonance energy transfer* (Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência)

GI – *Gradual Index* (Índice Gradual)

GUM – Guia para expressão de incerteza de medição,

HMD – *Hexamethyl diamine* (Hexametil diamina)

HMDA – *Hexamethylenediamine* (hexametilendiamina)

IEAv – Instituto de Estudos Avançados
IgA – *immunoglobulin A* (imunoglobulina A)
IgG – *immunoglobulin G* (imunoglobulina G)
iLSPR – *interference Localized Surface Plasmon Resonance* (Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada por interferência)
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LbL – *Layer-by-Layer* (Camada por Camada)
LEC – Laboratório de Eletromagnetismo Computacional
LED – *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)
LIF – Laboratório de Instrumentação e Fotônica
LIF – Laboratório de Instrumentação e Fotônica
LPG – *Long Period Grating* (Rede de Período Longo)
LSPR – *Localized Surface Plasmon Resonance* (Ressonância Plasmônica de Superfície Localizado)
MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura
MM – *Multi Molde* (multimodo)
MPN-PCR – *Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction* (Número Mais Provável - Reação em Cadeia da Polimerase)
m-POF – *micro Plastic Optical Fiber* (micro fibra de plástico)
NHS – *N-hydroxysuccinimide* (N-hidroxissuccinimida)
PAA – *poly(acrylic acid)* Poli (ácido acrílico)
PAH – *poly(allylamine hydrochloride)* (Poli (cloridrato de alilamina))
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEI – *Polyethyleneimine* (Polietilenimina)
PI – *Propidium Iodide* (Iodeto de Propídio)
PIMs – Polímeros de Impressão Molecular -,
PMMA – *Polymethylmethacrylate* (Polimetilmetacrilato)
PNAs – *Peptide Nucleic Acids* (Ácidos Nucléicos Peptídicos)
POF – *Plastic Optical Fiber* (Fibra Óptica Plástica)
PS – *Polystyrene* (Poliestireno)
PVA – *poly(vinyl alcohol)* (Álcool polivinílico)
PVDF – Polyvinylidene fluoride (Fluoreto de polivinilideno)
RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SI – *Step Index* (Índice Degrau)

SM – *Single Mode* (Monomodo)

SPR – *Surface Plasmon Resonance* (Ressonância Plasmônica de Superfície)

TSA – *Tryptic Soy Agar* (Agar de Soja Trípica)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UIR – Unidade de Índice de Refração

WDM – *Wavelength-division Multiplex* (Multiplexação por divisão de comprimento de onda)

Lista de Símbolos

- A_b – área de contato da bactéria com a fibra
- A_s – área útil do sensor
- b – número total de bactérias no sensor
- C1 – camada 1 de bactérias
- C2 – camada 2 de bactérias
- D_b – diâmetro da bactéria
- D_s – diâmetro do sensor
- GI – Gradual Index (Índice Gradual)
- Irel – Intensidade espectral relativa emitida pelo LED
- k – número de onda
- L_b – comprimento da bactéria
- L_s – comprimento da parte sensível
- N_0 – reta normal à superfície da POF
- n_1 – índice de refração da fibra
- N_1 – reta normal à superfície C_1
- n_2 – índice de refração do meio externo
- N_2 – reta normal à superfície C_2
- n_A – índice de refração medido com a plataforma Arduino.
- $n_{\text{água}}$ – índice de refração da água
- n_b – índice de refração da bactéria
- n_L – índice de refração medido com o Amplificador *Lock-in*
- n' – índice de refração de uma fibra curvada
- P_s – potência total de saída
- r – distância entre o centro da curva e a luz guiada
- R – raio da curva
- R^2 – coeficiente de determinação
- S – sensibilidade do sensor
- SI – *Step Index* (Índice Degrau)
- Srel – sensibilidade espectral relativa do fotodiodo
- S_1 – Sensor 1
- S_2 – Sensor 2
- T – coeficiente de transmissão

t – tempo

v_1 – velocidade da onda na fibra

v_2 – velocidade da onda no meio externo

V_{out} – Tensão de saída

z – direção de propagação na fibra

z_p – distância de meio período entre sucessivas reflexões na fibra esticada

γ – coeficiente de atenuação

δ – fase da onda

θ_0 – ângulo de incidência na superfície da POF

θ_1 – ângulo de incidência na superfície C_1

θ_2 – ângulo de incidência na superfície C_2

θ_c – ângulo crítico

θ_i – ângulos de incidência

θ_t – ângulos de transmissão

θ_ϕ – ângulo entre o caminho do feixe luminoso e a tangente da interface externa da curva.

λ – comprimento de onda

μ_1 – permeabilidade da fibra

μ_2 – permeabilidade do meio externo

ρ – raio do núcleo da fibra

ϕ – ângulo de curvatura da fibra

ϕ_p – ângulo entre duas reflexões consecutivas na superfície externa

ψ – onda eletromagnética

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação e importância do tema

O combate às doenças é um desafio constante a manutenção da vida. Desta forma, ensaios de diagnóstico precisam estar disponíveis para o trabalho tanto de combate quanto de prevenção de patógenos., agentes específicos causadores de doenças. Além disso, estes ensaios precisam ser de fácil operação e de resposta rápida, pois em muitos ambientes é vital buscar a detecção imediata de contaminantes, por exemplo, para a avaliação da qualidade da água, diagnósticos clínicos ou ações que visem à segurança alimentar.

Refletindo essencialmente sobre o papel da água na vida humana, observa-se que ela apresenta um grande potencial disseminador de micro-organismos quando está contaminada. Como elemento essencial à vida, a água pode ser um veículo de transmissão de vários tipos de micro-organismos, sejam eles naturais do ambiente ou liberados por organismos hospedeiros infectados que disseminam doenças.

Desastres naturais como as enchentes, ou mesmo a falta de tratamento adequado do esgoto doméstico ou industrial, levam ao risco de contaminação e precisam ser tratados sempre em caráter de urgência. Previamente ao tratamento vem o diagnóstico, etapa em que a utilização de sensores é altamente relevante. Muitos micro-organismos associados à água são também transmitidos por alimentos, que geram possíveis infecções.

Os métodos convencionais para a detecção de agentes patogênicos dependem de técnicas clássicas que envolvem a necessidade de pessoal e laboratórios especializados, além de serem em sua maioria métodos que demandam um tempo maior de processamento. Um crescimento significativo em tecnologias de biossensores vem substituindo esses métodos de detecção convencionais.

Para se compreender um biossensor é preciso saber o que é um sensor ou ainda um transdutor. Transdutores são sistemas de conversão de uma forma de energia que está relacionada à outra através de uma relação conhecida. Os sensores, por outro lado são apenas as partes sensitivas dos transdutores [1]. Os biossensores, por sua vez, são

sensores que utilizam um elemento de reconhecimento biológico que interage com a amostra e produz um sinal correspondente, o qual é usado pelo transdutor [2]. De forma ainda mais específica, alguns biossensores utilizam a reação imunológica, sendo o antígeno ou o anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. Estes dispositivos são então conhecidos como biossensores por imunocaptura, ou seja, imunossensores [3].

Durante as duas últimas décadas, registrou-se um grande número de publicações na área das aplicações de sensores à fibra óptica. Um sensor à fibra óptica pode ser definido como um dispositivo através do qual um mensurando físico, químico ou biológico, interage com a luz guiada pela fibra óptica (sensor intrínseco) ou com a luz guiada até a região de interação pela fibra óptica (sensor extrínseco), para produzir um sinal óptico que será correspondente ao parâmetro que se pretende medir. Estes sensores são projetados de modo que o mensurando interaja com um ou mais parâmetros ópticos da luz, sejam eles intensidade, fase, polarização ou comprimento de onda [4].

Normalmente estes sensores são utilizados para monitorar as concentrações em processos químicos ou biológicos, configurando-se neste último caso como os biossensores. Um parâmetro óptico muito importante e utilizado na implementação dos biossensores é o processamento e identificação da variação do índice de refração no meio externo à fibra óptica, sendo a investigação desta característica necessária em um grande número de aplicações tanto em ambientes industriais quanto em estudos científicos [5].

O princípio físico fundamental para o funcionamento dos sensores à fibra óptica plástica (POF), desenvolvidos neste trabalho, é a interação da amostra com a luz guiada por uma fibra curvada. A curva na fibra cria uma região sensível ao meio externo, provocando alterações na amplitude da luz guiada em conformidade com o índice de refração do meio externo em que a fibra estiver imersa, ou seja, a amostra, o mensurando, ou o ainda chamado de analito a ser investigado.

Um processo importante e amplamente utilizados na otimização dos sensores é a modelagem computacional. Através de programas desenvolvidos para modelagem de fibras ópticas e seu comportamento, torna-se possível prever possíveis problemas e ajustar os parâmetros necessários para aprimorar a funcionalidade do sistema, melhorando sua sensibilidade.

Durante a caracterização dos sensores, foram utilizadas diferentes concentrações de sacarose com índices de refração que simulam as suspensões bacterianas em experimentos preliminares para calibração do sistema eletrônico [6]. Uma plataforma

Arduino (placa Arduino UNO) foi utilizada no sistema construído, tornando-o portátil e de baixo custo, sem perder a sensibilidade necessária para a detecção dos micro-organismos. Logo após foram utilizadas amostras de teste para identificar concentrações mínimas de 10^4 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) da bactéria *Escherichia coli*, utilizada como analito neste trabalho. A *E. coli* foi escolhida pois sua presença indica a presença de outros micro-organismos.

A partir dos resultados encontrados nas simulações e subseqüente comparações com os resultados experimentais, um processo inovador foi realizado, com a implementação de curvas na fibra em formas diferentes. Estas novas configurações de sensores permitiu um aumento na sensibilidade. A implementação destes novos imunossensores permitirá a análise da água em concentrações menores do que 10^4 UFC/ml, sendo um grande avanço para as pesquisas do laboratório.

Os pesquisadores do Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF) da COPPE/UFRJ já estão envolvidos no projeto de um biossensor, tendo a pesquisa desenvolvida até o momento gerado uma monografia, cinco dissertações de mestrado e uma tese de doutorado, além deste atual trabalho e de diversos artigos publicados em revistas e apresentados em congressos, sempre buscando aprimorar a eficiência, sensibilidade e incerteza da medição de bactérias em água através do biossensor que utiliza fibra óptica plástica [7], [8], [9], [10] e [11].

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um imunossensor à fibra óptica plástica para detecção da bactéria *Escherichia coli*, que identifique de forma rápida a contaminação microbiológica da água.

1.2.2 Objetivos específicos

São os objetivos específicos deste trabalho:

- Identificar a influência da casca da fibra no processo de funcionalização do imunossensor;
- Desenvolver um sistema eletrônico portátil e sensível para a rápida detecção de contaminação da água pela bactéria *Escherichia coli*, com uso do imunossensor;
- Investigar o funcionamento do sensor através de modelagem computacional, determinando seu desempenho dentro dos limites propostos;
- Comparar resultados de medição simulados e experimentais e propor possíveis alterações físicas na fibra óptica, visando o aumento da sensibilidade do imunossensor.

1.3 Organização do trabalho

No Capítulo 2 é realizada uma revisão bibliográfica sobre os métodos de detecção de micro-organismos e sobre o estado da arte em biossensores. Posteriormente a pesquisa segue na direção dos imunossensores que utilizam a funcionalização do PMMA (*polymethylmethacrylate*). Alguns métodos de funcionalização são apresentados, inclusive o utilizado neste trabalho.

A seguir no Capítulo 3 são apresentados os fundamentos teóricos da fibra óptica plástica e alguns resultados de pesquisas realizadas com fibras ópticas atuando como elemento sensor em refratometria. É feita uma análise preliminar das características do sensor a ser implementado.

O Capítulo 4 apresenta a metodologia empregada na pesquisa, iniciando-se com a morfologia da *Escherichia coli* e uma estimativa teórica das prováveis limitações do sensor na detecção de bactérias. São apresentados também o processo de fabricação dos sensores, a montagem experimental, a configuração eletrônica que utiliza o amplificador Lock-in, as configurações eletrônicas implementadas com a plataforma Arduino e o processo de avaliação das incertezas nas medidas realizadas. O protocolo utilizado no processo de remoção da casca da fibra e os protocolos químico e biológico utilizados na funcionalização e imobilização do imunossensor são também detalhados neste capítulo.

No capítulo 5 são desenvolvidas modelagens computacionais tanto para o processo de calibração quanto para o funcionamento do imunossensor. Estas simulações são comparadas aos resultados experimentais nos capítulos posteriores.

Em seguida, no Capítulo 6, são apresentados os resultados dos ensaios preliminares realizados com o sensor na medida de índice de refração, com o objetivo de estimar a incerteza e a sensibilidade dos sensores fabricados. Os resultados encontrados são comparados com as simulações realizadas no capítulo anterior. Essas discussões e análises são estendidas ao Capítulo 7, apresentando os resultados e discussões do imunossensor atuando na medida e avaliação das suspensões de bactéria *Escherichia coli* em diferentes concentrações. Os resultados modelados para o imunossensor são também comparados neste capítulo.

Uma proposta de implementação de sensores com diferentes formas é apresentada no capítulo 8. Uma modelagem computacional foi realizada, tratando estas novas formas estudadas na literatura, utilizando as características da POF. As conclusões e propostas de continuidade do trabalho através de novos experimentos, controles e alterações no sistema são apresentadas no Capítulo 9.

No Capítulo 10 encontram-se as referências bibliográficas utilizadas neste trabalho. O programa completo desenvolvido para a plataforma Arduino consta do Anexo A e os artigos apresentados ao longo do projeto estão listados no Anexo B.

Capítulo 2

Revisão bibliográfica

Visando facilitar a compreensão geral dos temas abrangidos neste trabalho, apresenta-se, a seguir, uma revisão bibliográfica sobre os métodos de detecção de micro-organismos, sobre alguns modelos de biossensores em desenvolvimento, além de processos de funcionalização do PMMA, material utilizado no imunossensor objeto de estudo.

2.1 Métodos de detecção de micro-organismos

A detecção dos micro-organismos (organismos vivos que só podem ser vistos com o auxílio de um microscópio) já foi vastamente estudada e vários métodos de detecção já foram desenvolvidos. É possível então, para facilitar o estudo, dividi-los entre os métodos convencionais, também conhecidos como métodos padrão, ou clássicos e os métodos rápidos, sendo estes desenvolvidos com o objetivo de encurtar o tempo de obtenção dos resultados nas análises.

2.1.1 Métodos convencionais

Os métodos convencionais para detecção, identificação e classificação de micro-organismos são baseados na presença ou ausência de determinantes fisiológicos como peculiaridades metabólicas ou estruturais. Eles envolvem o cultivo em meios seletivos ou não seletivos, análise da morfologia, e propriedades bioquímicas e/ou imunológicas.

Os métodos dependentes de cultivo do micro-organismo em meios seletivos e diferenciais são mais simples. Dentre estes o método de cultura e plaqueamento é o mais utilizado para detectar micro-organismos, sendo um método padrão até hoje. Este método é falho quando aplicado a micro-organismos não cultiváveis, e também diante das exigências fisiológicas, como nutrientes, pH, temperatura e atmosfera específicas de certos grupos microbianos, com estado viável porém não cultivável. Em alguns casos podem ser necessários de 4 a 9 dias para se obter um resultado negativo, e 14 a 16 dias

para se obter um resultado positivo, sendo impraticável para aplicações industriais, em especial no setor alimentício [12].

Os métodos independentes de cultivo são mais abrangentes quando se trata de amostras ambientais. Eles podem alcançar todas as espécies que não são cultiváveis em laboratório.

A microscopia é um dos métodos mais simples, pois não depende de cultivo em laboratório. Ela permite a visualização direta da amostra, mantendo as proporções reais do seu *habitat*.

Os testes bioquímicos permitem a detecção dos micro-organismos de maneira indireta através de substratos presentes em uma determinada amostra. Tem-se, por exemplo, a microradioautografia, pela qual, a partir de certa quantidade absorvida de um substrato específico marcado radioativamente por uma célula, pode-se detectar e quantificar a população ativa que está usando este substrato.

2.1.2 Métodos rápidos

Os métodos rápidos são assim conhecidos por utilizarem técnicas que permitem detecções e identificações mais rápidas, sensíveis e específicas do que os testes convencionais [10]. Dentre os métodos rápidos, os métodos enzimáticos são amplamente utilizados, porém apresentam alto custo e até 24 horas de incubação para a detecção de contaminação. O uso de técnicas moleculares também permite a detecção rápida de micro-organismos. Neste caso, por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem como base a amplificação de material genético extraído de amostras, que pode ser posteriormente comparado a um banco de dados. Esta tecnologia consiste na amplificação de ácidos nucleicos. Ela é amplamente utilizada na detecção de bactérias desde os anos 80. Através do isolamento, amplificação e quantificação de uma sequência de DNA (Ácido Desoxirribonucleico), este método tem se difundido em diferentes técnicas, como: PCR em tempo real, PCR multiplex e transcriptase reversa PCR (RT-PCR) [13].

A Eletroforese é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de uma diferença de potencial. Ela também pode ser combinada com o PCR na análise de DNA [12]. Outras técnicas podem ser combinadas, como o sensor de superfície de onda acústica [13], a utilização

do campo evanescente em biossensores (utilizada no presente trabalho), a técnica de Número Mais Provável (MPN-PCR), Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), *Light Cycler real-time PCR* (LC-PCR), PCR-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ensaios de hibridização, a técnica de FISH (hibridização fluorescente in situ), entre outras [14].

Os métodos baseados na utilização de anticorpos também oferecem diversas ferramentas eficientes para a detecção de micro-organismos. O ensaio imunoenzimático ELISA é uma técnica muito aplicada atualmente e serve de fundamento para diversas outras técnicas, como a que utiliza fibras ópticas revestidas de anticorpos para detecção de micro-organismos [6]. As técnicas baseadas em ELISA combinam a especificidade de anticorpos e a sensibilidade dos ensaios imunológicos utilizando anticorpos ou antígenos.

Um método conceituado atualmente é a Espectrometria de Massas. Esta técnica é utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Ela se baseia em propriedades físicas do analito de forma a determinar a relação entre a massa e a carga de espécies ionizadas em fase gasosa. A bactéria é analisada como uma mistura de biomoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídeos, DNA, RNA (Ácido Ribonucleico), entre outros. Essa mistura de moléculas vai gerar um espectro de massas que é característica de cada espécie. Assim, micro-organismos diferentes apresentam espectros de massa diferentes. A análise é dependente de bancos de dados disponíveis comercialmente. Esses dados são de isolados clínicos o que se apresenta como uma desvantagem para quem trabalha com isolados ambientais [15].

Em busca da diminuição dos custos e do tempo das análises, métodos alternativos vêm sendo testados para a detecção de micro-organismos ou de seus produtos metabólicos, em diferentes tipos de amostra, incluindo água. Nesta direção são desenvolvidos os Biossensores.

2.2 Biossensores

Os Biossensores são dispositivos compactos de análise que incorporam um elemento de reconhecimento biológico, que pode ser uma enzima, anticorpo, proteína, ácido nucléico, célula ou tecido. Estes elementos podem ser também biomiméticos (Polímeros de Impressão Molecular - PIMs, aptâmeros, Ácidos Nucléicos Peptídicos -

PNAs) associados a um transdutor que processa o sinal produzido pela interação entre o elemento de reconhecimento e o analito (substância a ser detectada) [16].

Quando um elemento de reconhecimento caracterizado pelo transdutor interage com o analito, a variação de suas propriedades físico-químicas como pH, transferência de calor, mudança de potencial, variação da massa, variação das propriedades ópticas ou eletromagnéticas, podem ser detectadas. O sistema transforma esta resposta do elemento de reconhecimento num sinal eletrônico que indica a presença do analito. Este é então o princípio utilizado para o funcionamento dos Biossensores.

Os Biossensores apresentam significativas vantagens em relação às técnicas anteriormente utilizadas, destacando-se:

- Alta seletividade – elementos de reconhecimento específicos podem ser utilizados, como, por exemplo, anticorpos [16];
- Alta sensibilidade – alguns sistemas com biossensores se apresentam capazes de identificar quantidades muito pequenas do analito, como na detecção de resíduos de praguicidas [17];
- Reduzido tempo de análise – os trabalhos desenvolvidos com biossensores visam à diminuição do tempo de análise frente aos métodos convencionais [18].

Além das características próprias de sensores eletrônicos, como:

- Portáteis – possibilitam análises in situ;
- Miniaturizáveis – devido aos avanços em microeletrônica e nanotecnologia torna-se possível a redução das dimensões destes dispositivos, permitindo sua utilização em locais onde o tamanho do dispositivo ou a localização da medida sejam fatores limitantes;
- Automatizáveis – favorecimento da utilização em sistemas que, por exemplo, monitoram processos industriais ou com grande número de medições;
- Baixo custo – o emprego de materiais pouco dispendiosos, como a fibra óptica, leva à diminuição dos custos na elaboração do sistema;

Encontram-se na literatura biossensores utilizados em diferentes aplicações, por exemplo, um biossensor compacto e de baixo custo que utiliza fibra óptica de sílica e

foi desenvolvido para identificar especificamente se as *Escherichia coli* O157:H7 estão mortas ou vivas [19]. O dispositivo utiliza-se de uma combinação de fibra afinada (*taper*), ativadas por anticorpo como sonda, e iodeto de propídio (PI) como o corante fluorescente. Utilizando-se o método de fluorescência, obteve-se um limite de detecção de 10^4 células/ml de *E. coli* vivas num tempo de aproximadamente 40 minutos.

Uma recente revisão apresenta várias técnicas de nanossensores que utilizam anticorpos, dentre elas: nanossensores eletroquímicos; nanossensores ópticos; nanossensores magnéticos e nanossensores piezoelétricos. No grupo dos nanossensores ópticos, estudos têm sido desenvolvidos para aperfeiçoar as técnicas como: ELISA, Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) e Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada por interferência (iLSPR) [20].

Em destaque, os biossensores ópticos baseados em SPR que utilizam filmes finos de ouro têm sido amplamente empregados [21]. No entanto, nano-biossensores ópticos podem também ser criados usando metais nanoestruturados, ao invés de filmes finos. As propriedades ópticas de nanoestruturas metálicas estão ligadas ao processo de LSPR. O LSPR é um fenômeno óptico gerado pelas oscilações coletivas do gás de elétrons em nanoestruturas metálicas cercadas por um dielétrico. Os materiais típicos para aplicações plasmônicas são os metais nobres, em especial a prata ou o ouro. Apesar da prata exibir mais nítidas e intensas bandas LSPR do que o ouro, a maior estabilidade química de nanoestruturas de ouro tem favorecido a sua aplicação para biossensores.

A implementação de um sensor baseado em LSPR com fibra óptica pode oferecer muitas vantagens, especialmente a de evitar o uso da óptica aberta e volumosa para interrogação com filmes metálicos em contato com a substância a ser analisada, o analito [22]. Sensores LSPR podem também ser utilizados para detectar diferentes espécies de bactérias [23]. Tanto fibras ópticas de sílica quanto fibras ópticas plásticas têm sido largamente utilizadas para a realização da técnica LSPR [24], [25], [26]. Recentemente um trabalho desenvolvido no LIF apresentou uma comparação entre a técnica LSPR e o sensor em forma de U na POF [27].

Da mesma forma que na medição de índice de refração com fibras ópticas plásticas, o uso de *taper* foi feito na ponta de uma fibra de sílica de 600 μm para detecção de bactérias [28]. Essa região sensível foi incubada com proteína G e anticorpo. Utilizando a técnica de Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência (FRET) a resposta deste sensor foi da ordem de 10^2 UFC/ml.

Outra técnica explorada em sensores à fibra óptica é a fabricação de uma Rede de Período Longo (*Long Period Grating* - LPG). Uma modulação periódica feita no núcleo da fibra monomodo que a torna sensível à variação de índices de refração. Neste caso, após a funcionalização foi feita apenas uma análise qualitativa da presença da bactéria *E. coli* [29]. Estes são apenas alguns exemplos do avanço dos biossensores na atualidade.

O biossensor por imunocaptura, ou seja, o imunossensor é um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor [3]. Os anticorpos (Ac) são moléculas de glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B em resposta à presença de um imunógeno (substância estranha ao organismo), com alta especificidade e afinidade, ligam-se às 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). A Figura 2.1 demonstra a estrutura do anticorpo.

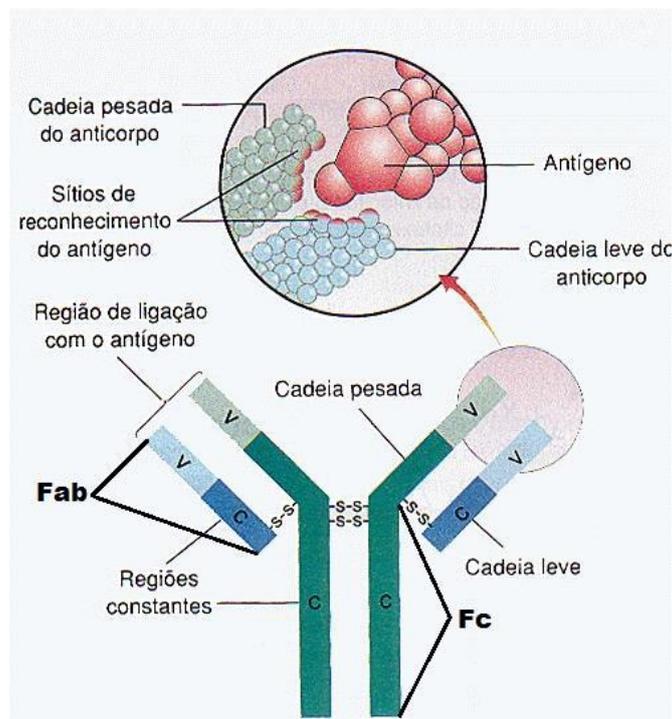


Figura 2.1: Esquema de estrutura básica do anticorpo IgG, onde V são as regiões variáveis e C as regiões constantes, nas porções variável (Fab) e cristalizável (Fc). No detalhe é mostrada a região de ligação com o antígeno [30].

O funcionamento do imunossensor depende da correta imobilização dos ligantes à superfície dos sensores. Esta superfície precisa ser homogênea e obedecer a orientação necessária. Desta forma é imprescindível a utilização de uma técnica de imobilização que permita essa ligação correta dos anticorpos, com a parte sensora. A eleição de um ou outro procedimento depende da natureza do elemento biológico, do tipo de transdutor, da natureza físico-química do analito e das condições de trabalho do imunossensor [31].

Os sítios da porção cristalizável são específicos para algumas proteínas, como, por exemplo, para a proteína A. Trata-se de uma proteína encontrada na parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus* que contém quatro domínios de ligação com a porção constante (Fc) dos anticorpos. Devido à sua habilidade de ligação seletiva à porção Fc de diversas imunoglobulinas, ela permite que a região variável (Fab) fique livre para a ligação com o antígeno. Assim, esta proteína tem sido usada na orientação de imunoglobulinas em diversos tipos de imunoensaios [3]. A utilização da proteína A na preparação do sensor permite uma melhor uniformidade e homogeneidade da área sensora. Observa-se na Figura 2.2 (a) o que ocorre quando a imobilização do anticorpo é feita diretamente com a fibra. Desta forma a região Fab nem sempre fica livre para ligação com o antígeno. Utilizando-se a proteína A, conforme demonstrado na Figura 2.2 (b), a mesma se liga a região Fc do anticorpo, deixando livre a região Fab.

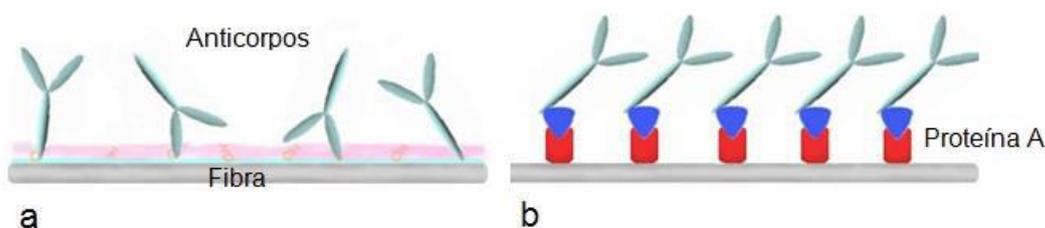


Figura 2.2: Ligação dos anticorpos à superfície da fibra. (a) Anticorpos ligados à fibra sem a utilização da proteína A como imobilizante. (b) Anticorpos ligados corretamente à fibra devido à utilização de proteína A. Figura adaptada de [9].

Existem outros métodos de imobilização mais fáceis, como a adsorção física, porém, neste caso, a orientação aleatória dos anticorpos prejudica a eficiência do imunossensor [32]. A utilização da proteína A como imobilizadora de anticorpos já possui sua eficácia comprovada, por isso foi utilizada no protocolo de fixação do presente trabalho [33].

2.3 Funcionalização do PMMA nos imunossensores

Considerando-se o PMMA como material constituinte do sensor POF, compreender o processo de funcionalização do PMMA se tornou imprescindível para o aprimoramento do sensor implementado. Assim, apresenta-se a seguir alguns métodos de funcionalização pesquisados.

2.3.1 Método utilizando fragmentos Fab'

O método a seguir foi apresentado na literatura visando manter livre a porção denominada Fab' no processo de imobilização [34]. O processo de formação desta porção pode ser observado na Figura 2.3. O autor propõe que o anticorpo seja cortado, separando-se a parte Fab' da parte Fc. Desta forma, a imobilização é feita utilizando-se somente a região Fab', que se liga ao antígeno. Esta técnica elimina o risco de uma imobilização incorreta por parte do anticorpo, proporcionando ainda uma melhor distribuição do anticorpo na fibra, considerando-se ainda que a porção Fab' é bem menor do que o anticorpo completo.

As enzimas proteolíticas, tais como a papaína na presença de cisteína, são capazes de clivar o anticorpo (Figura 2.3), produzindo dois fragmentos Fab e uma região Fc. Estes fragmentos Fab não contêm sulfetos nucleofílicos perto de suas C-terminais, em comparação com os fragmentos de Fab' (Figura 2.3). Da mesma forma, a utilização de ficina na presença de grandes quantidades de cisteína, reduz diretamente o anticorpo inteiro para fragmentos Fab. A elastase é outra enzima que cliva o anticorpo como a papaína, resultando em dois fragmentos Fab a partir da clivagem inicial. Outra enzima, a pepsina, cliva o fragmento Fab para produzir um $F(ab)_2$, unidade em condições ácidas que consiste em dois fragmentos Fab ligados por meio da ponte dobradiça de dissulfureto e um fragmento Fc. O $F(ab)_2$, em seguida, deve ser clivado com um agente de redução apropriado. Pós-clivagem, os fragmentos Fab' resultantes contêm importantes aminoácidos de cisteína próximas do C-terminal que podem ser utilizados como âncoras para a imobilização de nucleofílicos. Da mesma forma, a utilização de ficina na presença de níveis baixos de cisteína irá reduzir um anticorpo completo a unidades de $F(ab)_2$.

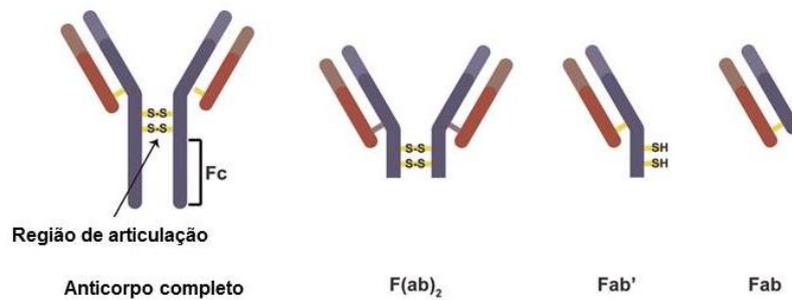


Figura 2.3: Modelo de anticorpo completo e cortado em partes F(ab)₂, Fab' e Fab. Figura adaptada de [34].

Recentemente foi realizado um estudo sobre a imobilização de fragmentos da região Fab em superfícies de plástico [35], sendo representado na Figura 2.4. A cadeia pesada (Fab-H) e a cadeia leve (Fab-L) foram sintetizadas separadamente, ambos com C-terminal dos peptídeos de ligação ao poliestireno (PS), ou PS-marcado. A fim de produzir uma região imobilizada, especificamente orientada com fragmentos Fab', as moléculas de Fab-H e Fab-L reagiram em conjunto ou sequencialmente, na presença de uréia, com PS hidrofílico. Depois de ligadas à superfície, as cadeias desnaturadas Fab-H e Fab-L são dobradas para produzir fragmentos Fab' imunologicamente ativos. A imobilização de ambas as cadeias juntas (Figura 2.4 (a)) produziram fragmentos Fab' que se ligam a 1/10 da quantidade de analito ligado com fragmentos Fab' produzidos a partir de imobilização sequencial das cadeias (Figura 2.4 (b)). Isto foi determinado utilizando-se ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), envolvendo análises de quatro diferentes proteínas. A ligação da cadeia Fab-L antes da cadeia Fab-H produziu uma superfície com mais fragmentos Fab' imunologicamente ativo em comparação com a sequência de ligação oposta. Para ambos os processos de um passo e de dois passos, fragmentos de Fab' produzidos a partir de cadeias sem PS-marcados mostraram pouca ou nenhuma atividade imunológica, o que ilustra a importância da ancoragem PS-marcados.

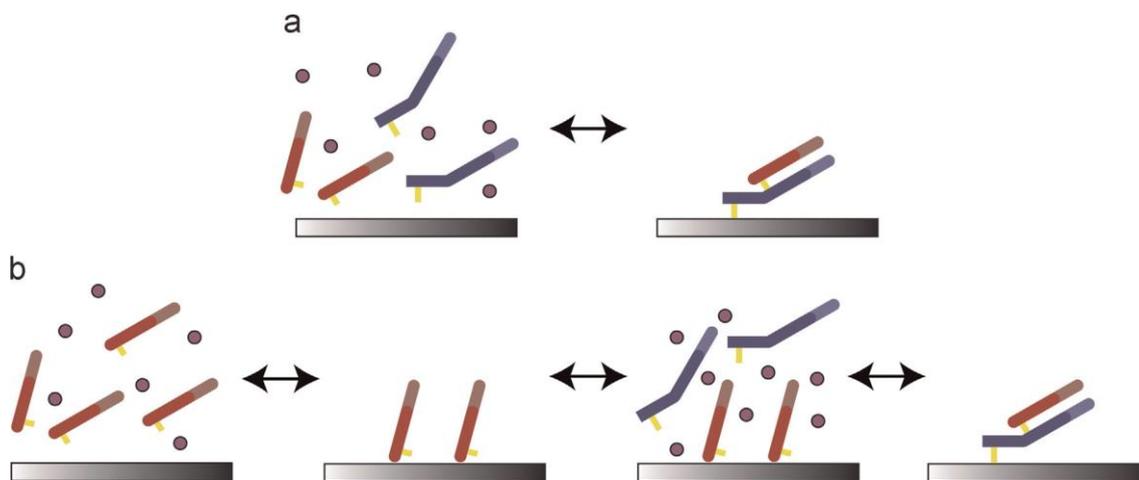


Figura 2.4: a) Representação do processo de imobilização das cadeias Fab-H e Fab-L sendo realizadas simultaneamente; b) representação do processo de imobilização de forma sequencial das cadeias Fab-L e Fab-H [34].

Um problema apresentado por esta técnica foi o custo para dividir o anticorpo, separando a parte Fab'. O autor também cita a utilização da proteína A como alternativa para a imobilização. A fibra é aminada com uma solução de glutaraldeído e assim a proteína A se liga ao PMMA. Posteriormente a proteína A se liga especificamente a região Fc do anticorpo, fazendo com que ele fique com a porção Fab para cima, ou seja, livre para a ligação do antígeno.

2.3.2 Método LbL

Em outro trabalho pesquisado a fibra de PMMA é funcionalizada pelo método LbL (*layer-by-layer*), ou seja, camada por camada. Um filme é formado sobre o PMMA por depósito de camadas alternadas de polímero catiônico e aniônico chamados respectivamente de *poly(allylamine hydrochloride)* (PAH) e *poly(acrylic acid)* (PAA). [36].

A fibra de PMMA pode ser carregada positiva ou negativamente dependendo do meio utilizado. Assim, é possível formar um filme LbL na fibra. PAH catiônico e PAA aniônico foram dissolvidos separadamente em solução NaCl (0,5 M, pH 4,0) em 2 µg/ml e 1 µg/ml respectivamente. A Figura 2.5 (a) mostra o processo de formação do filme. Uma fibra de PMMA carregada negativamente foi imersa na solução de PAH, depois foi enxaguada em água ultrapura. Sequencialmente, a mesma amostra é conduzida à solução de PAA. Depois de repetir o processo várias vezes, o anticorpo

primário mIgG foi covalentemente ligado à camada PAA através do acoplamento EDC/NHS (Figura 2.5 (b)). O grupo carboxílico da camada PAA foi ativado em uma mistura da solução de EDC e NHS (cada concentração em água pura = 0,1 M; tempo de incubação 30 min.) seguido por lavagem em água ultrapura. Depois sofreu reação com mIgG dissolvido em PBS-T (PBS – *Phosphate Buffered Saline* - Tampão Fosfato Salino) por 1 hora. Finalmente, ésteres ativos que não reagiram, dos grupos carboxila foram incubados por 30 minutos em etanolamina (1 M, pH 8,5) e depois a fibra de PMMA foi imersa em solução 1 wt% BSA/PBS-T (BSA – *Bovine Serum Albumin* – Albumina de Soro Bovino) para evitar uma maior ligação não específica.

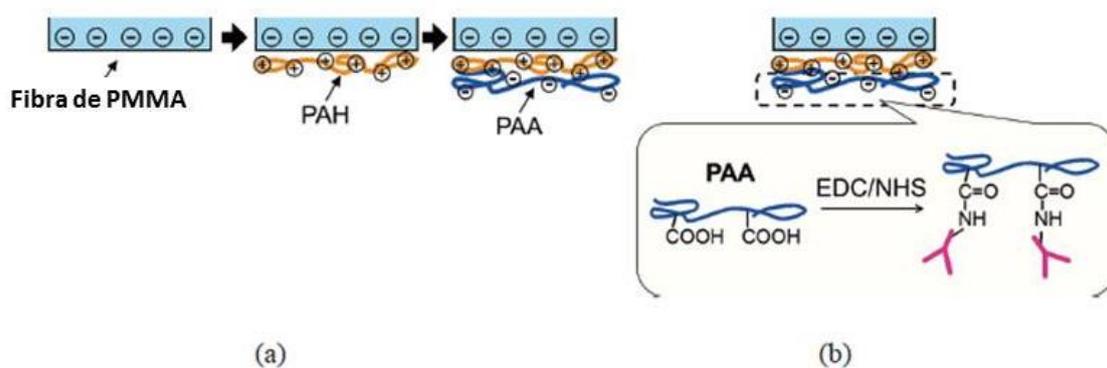


Figura 2.5: (a) Processo de formação do filme LbL. (b) Ligação do anticorpo ao filme LbL. Figura Adaptada de [36].

Para caracterizar o imunossensor implementado, um anti-anticorpo (a-mIgG) foi incubado ao mesmo tempo tanto para a fibra quanto para o método ELISA e um substrato fluorescente foi adicionado. Foi observada a variação da intensidade emitida pela fluorescência durante 5 minutos, para concentrações do anticorpo de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,4 $\mu\text{g/ml}$, 1,6 $\mu\text{g/ml}$, 6,3 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ e 100 $\mu\text{g/ml}$, conforme mostra a Figura 2.6 (a). A partir destes valores, foi gerada uma curva de calibração do imunossensor, observando-se a absorbância do imunossensor em paralelo com os resultados do método ELISA para as diferentes concentrações do anticorpo. A comparação dos métodos e os resultados da calibração são mostrados na Figura 2.6 (b). Observa-se que as curvas são similares, o que valida o processo de imobilização do imunossensor. Este sensor foi usado para monitoramento de partículas bioaerosol.

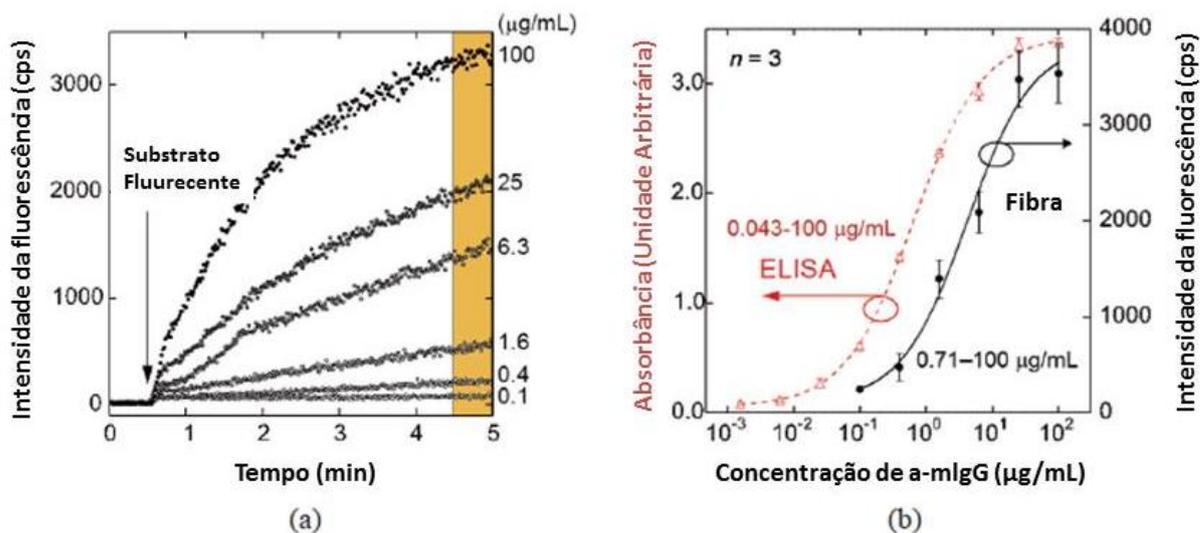


Figura 2.6: a) Variação da intensidade da fluorescência com o tempo. b) Calibração do imunossensor comparado com o método ELISA. Figura adaptada de [36].

2.3.3 Método com nanofibras carregadas

Com a utilização de uma técnica muito parecida com a apresentada anteriormente [36], nanofibras carregadas positivamente e negativamente são produzidas utilizando o material *poly(vinyl alcohol)* (PVA) que é incorporado ao PMMA [37].

Encontram-se também na literatura nanofibras que foram fabricadas com cargas positivas e negativas [38], [39]. Elas foram então testadas para capturar células de *E. coli*. Como a *E. coli* é carregada negativamente, ela é atraída pelas nanofibras positivamente carregadas e repelida pelas nanofibras negativamente carregadas. Um anticorpo Anti-*E. coli* foi imobilizado nas nanofibras carregadas negativamente para capturar as *E. coli* com mais especificidade.

A Figura 2.7 mostra um esquema do resultado obtido no experimento. Observa-se claramente na Figura 2.7 (a) que a *E. coli* é atraída pelas nanofibras positivas. Entretanto, neste caso, qualquer tipo de *E. coli* será atraída pelo sistema. Na Figura 2.7 (b) a *E. coli* e as nanofibras se repelem por serem ambas negativas. Na Figura 2.7 (c) as nanofibras negativas, agora com anticorpo Anti-*E. coli* imobilizado, atraem apenas as *E. coli* específicas do anticorpo.

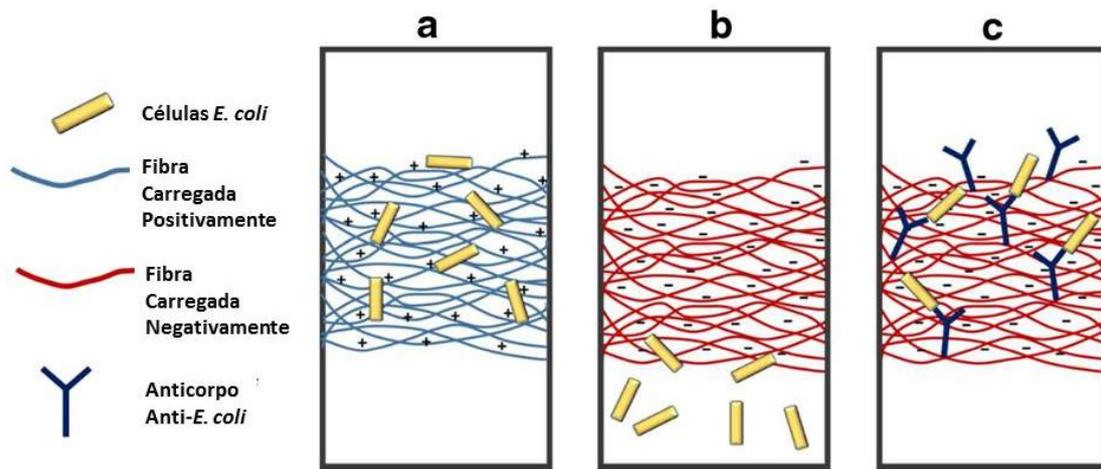


Figura 2.7: Esquema da captura da *E. coli* pelas nanofibras carregadas. (a) Nanofibras positivas atraem as células *E. coli* negativa. (b) Nanofibras negativas repelem as células *E. coli* negativa. (c) Nanofibras negativas com anticorpo Anti-*E. coli* atraem as células. Figura adaptada de [37]

Seis diferentes morfologias de tapetes de nanofibras foram testadas para análise da eficiência da captura das células de *E. coli* pelos tapetes de nanofibras de PMMA com PVA. As nanofibras carregadas negativamente resultaram num maior desvio padrão do que as retenções em fibras carregadas positivamente. Cada ponto na Figura 2.8 representa a média de três medidas. Esse experimento foi realizado antes dos testes com anticorpo.

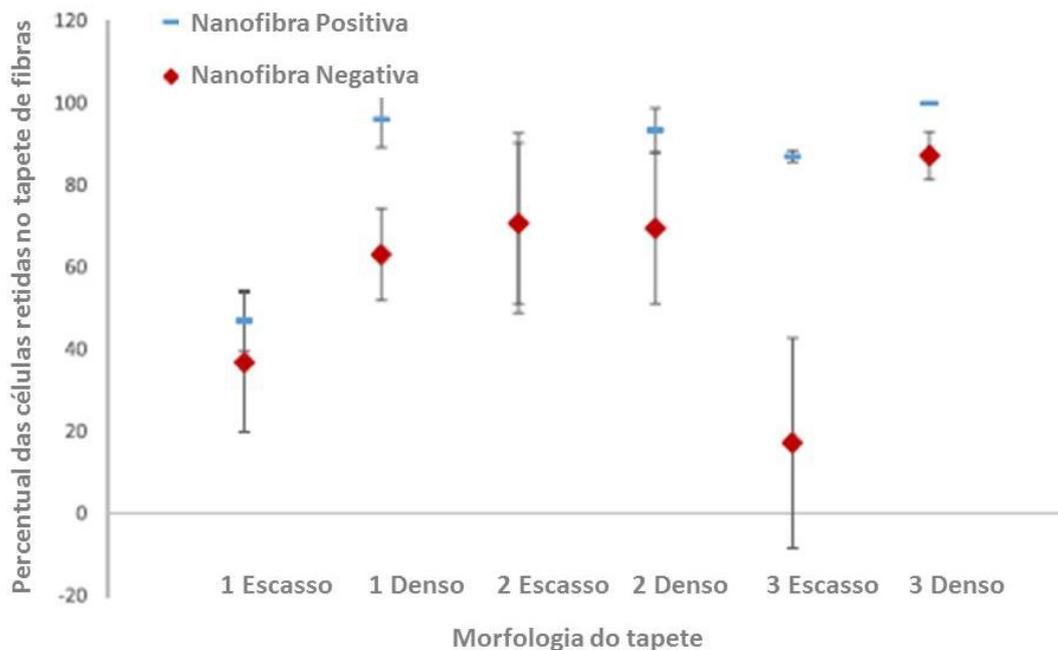


Figura 2.8: Análise da eficiência da captura das células de *E. coli* pelas nanofibras. Figura adaptada de [37].

O estudo mostra que a *E. coli* é atraída pelo PVA carregado positivamente, com uma eficiência de captura de 87 % das células. Entretanto neste caso, outras bactérias também seriam atraídas, eliminando a seletividade do sensor. A *E. coli* é repelida pelo PVA negativamente carregado, sendo apenas 17 % das células retidas. A carboxila na superfície do PVA permite a imobilização do anticorpo, usando o EDC/Sulfato-NHS para acoplamento. Assim, com o anticorpo ligado ao PVA apenas a *E. coli* específica se liga ao anticorpo, sendo capturada pelas nanofibras 71 % das células.

2.3.4 Comparação entre os métodos PEI, HMD e adsorção passiva

Um estudo realizado recentemente apresenta a comparação entre três métodos de imobilização do PMMA: O método *Polyethyleneimine* (PEI), o *Hexamethyl diamine* (HMD) e a adsorção passiva [40]. A adsorção passiva conta apenas com a ligação física entre as superfícies, sendo muito instável. Tanto o tratamento PEI quanto o HMD apresentam ligação covalente que resultaram da ligação cruzada da proteína à superfície modificada.

a. Método PEI

A amostra de PMMA foi colocada em solução de NaOH 1 M a 55 °C durante 30 minutos. A amostra foi imersa em 0,2 % de PEI à temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por um tratamento com glutaraldeído 1 % à temperatura ambiente durante 30 minutos. A amostra foi lavada com água destilada entre os passos, e em seguida seca numa corrente de nitrogênio seco. Depois disso, adicionou-se a proteína que foi mantida durante 1 hora. Além disso, um conjunto de experimentos para estudar o efeito do tempo de incubação na resistência de interação foi realizado, onde o tempo de incubação da proteína antes da lavagem foi variado.

b. Método HMD

Uma amostra de PMMA foi incubada com 10 % de HMD em 100 mM de tampão de borato, pH 11,5, durante 2 horas. Imersas em solução GA a 1 % durante 30 minutos. A amostra foi lavada com água destilada entre os passos, e em seguida seca

numa corrente de nitrogênio seco, seguindo-se a adição de BSA etiquetada durante 1 hora. Este método é similar ao utilizado em outros trabalhos [33].

c. Adsorção passiva

No processo de adsorção passiva a solução de proteína foi injetada diretamente e mantida durante 1 hora.

A Figura 2.9 mostra a mudança na intensidade do sinal da fluorescência através das técnicas de fixação no PMMA durante um intervalo do fluxo de lavagem. O tratamento PEI resultou no vínculo mais forte e mais alto de embalagem, enquanto a adsorção passiva foi a mais fraca.

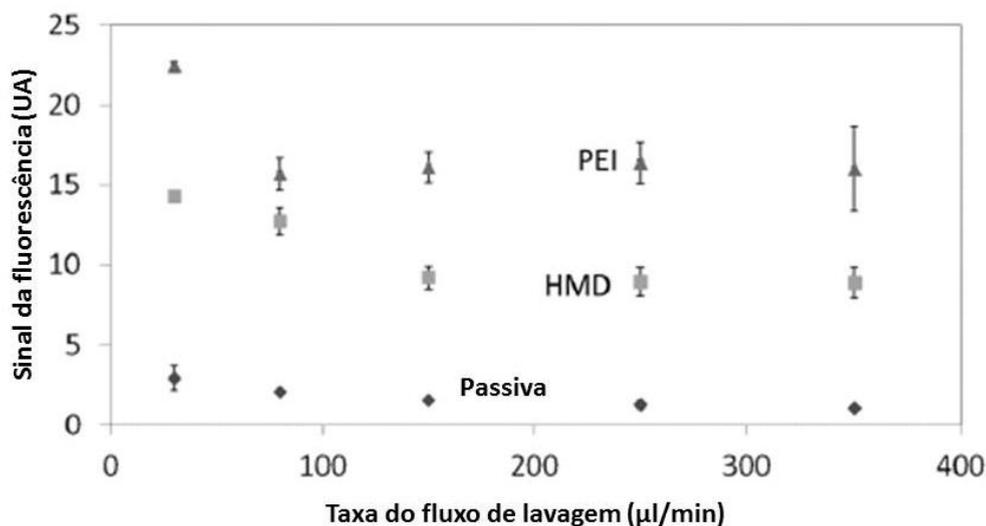


Figura 2.9: Comparação dos resultados entre as técnicas de imobilização PEI, HMD e adsorção passiva.

Figura adaptada de [40].

No caso do PEI a acomodação do material elevou em dez vezes a acomodação da proteína na superfície e no caso da utilização do HMD ocorreu um aumento de sete vezes.

2.3.5 Método de funcionalização para imobilização de DNA

Um método simples de funcionalização do PMMA foi desenvolvido através de um tratamento químico [33]. O autor propõe um procedimento rápido e simples de modificação da superfície do PMMA produzindo grupos amino primários, adequados

para imobilização de biomoléculas de diferentes tipos, como o DNA. O procedimento descrito é comparado com a modificação do PMMA realizada em outra publicação [41].

A Figura 2.10 mostra os produtos químicos usados para modificar os substratos de PMMA e para imobilizar covalentemente o DNA modificado na superfície aminada. Na Figura 2.10 (a) os ésteres de metilo, disponíveis no PMMA, em condições de pH básico, reagem com um elétron N doador presente no hexametilenodiamina (HMDA), dando origem as amins primárias sobre a superfície. Na Figura 2.10 (b) tem-se o protocolo para comparação com outra referência [41]. Na Figura 2.10 (c) o PMMA aminado foi tratado com o glutaraldeído homobifuncional reticulante que possui um grupo aldeído terminal que reage com os grupos amins primárias do PMMA, através de uma ligação amina. As sondas de DNA-NH₂ são, subsequentemente, colocadas para reagir com o outro terminal aldeído do agente reticulante, que cria uma ligação covalente entre a superfície e a sonda.

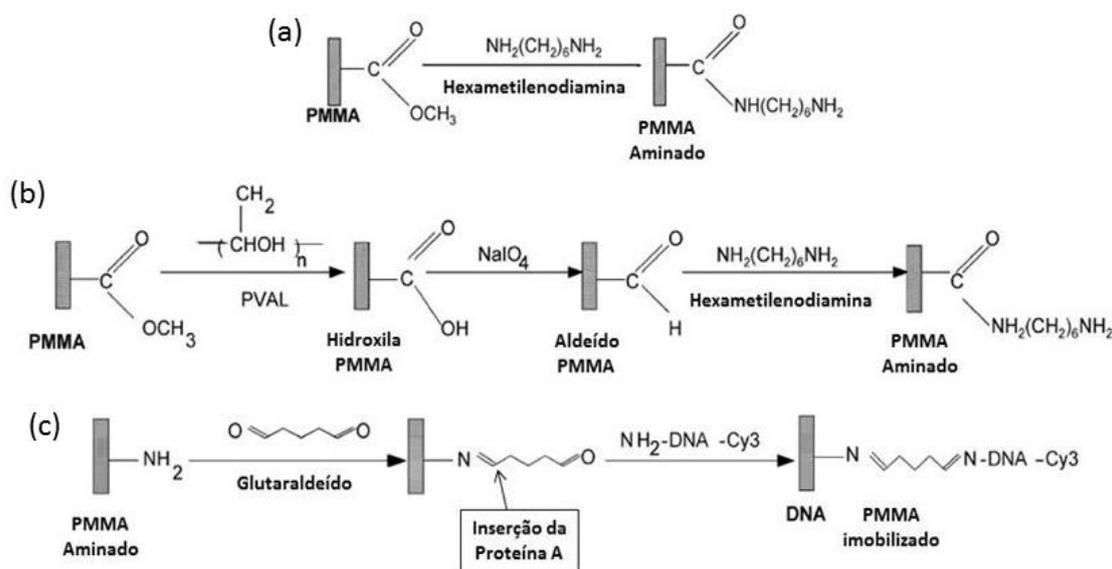


Figura 2.10: (a) Tratamento químico utilizado para aaminação do PMMA proposto pelo artigo [33]. (b) Tratamento químico utilizado para comparação do processo de aaminação do PMMA [41]. (c) Tratamento com glutaraldeído para fixação do DNA. Figura adaptada de [33]

O resultado do experimento realizado para avaliar a densidade das amins primárias está expresso na Tabela 2.1 (a), onde foi comparado com o processo de incubação realizado em meio aquoso [41], Tabela 2.1 (b). Observa-se que o protocolo representado na Figura 2.10 (a) é mais simples, entretanto apresenta densidade de 0,29 nmol NH₂/cm² de amins primárias, ou seja, quase o dobro da densidade de amins primárias apresentado pelo protocolo da Figura 2.10 (b), que foi de 0,16 nmol NH₂/cm².

Tabela 2.1: Quantificação dos grupos aminas no PMMA quimicamente modificado. Adaptada de [33].

Condições químicas de incubação		Densidade (nmol NH₂/cm²)
(a)	1 h	0.28 ± 0.03
	2 h	0.29 ± 0.02
(b)	Meio aquoso	0.16 ± 0.01

Por sua simplicidade e eficiência este protocolo foi o escolhido para utilização no presente trabalho, sendo utilizada a proteína A para imobilização, logo após a fixação do glutaraldeído, conforme indicado na Figura 2.10 (c). O protocolo biológico completo será descrito detalhadamente na metodologia apresentada no Capítulo 4.

Capítulo 3

Fundamentação teórica do sensor óptico

3.1 Características da fibra curvada

Para uma melhor compreensão do funcionamento do sensor desenvolvido, apresentam-se alguns conceitos do funcionamento de uma fibra óptica. Fibras ópticas são guias de onda, em que a luz é guiada pelo fenômeno da reflexão interna total, limitada pelo ângulo crítico (θ_c), determinado pela equação

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1}, \quad (3.1)$$

onde n_1 é o índice de refração do núcleo da fibra e n_2 é o índice de refração da casca.

Parte dos modos da luz guiada no núcleo são transferidos para a casca, sendo denominado de campo evanescente. Esta distância de penetração (d_p) dos modos na casca é conhecida também como comprimento de penetração, determinado pela Equação (3.2), onde o valor do campo evanescente cai 1/e do valor na interface núcleo/casca.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 (\sin^2 \theta - \sin^2 \theta_c)^{1/2}} \quad (3.2)$$

Cada um dos caminhos percorridos pelos raios de luz define um modo de propagação. As fibras ópticas são classificadas em monomodo (SM) e multimodo (MM), podendo ainda as fibras MM serem fabricadas com o índice degrau (SI) ou índice gradual (GI). As fibras SI tem um índice de refração constante em todo o núcleo, sofrendo uma mudança abrupta na interface núcleo/casca. As fibras GI tem uma distribuição parabólica do índice de refração, diminuindo gradualmente em função da distância radial a partir do centro do núcleo [42].

As fibras ópticas plásticas (POF) são normalmente MM, com exceção das POFs microestruturadas. A POF utilizada neste trabalho é MM, com 1000 μm de diâmetro total, sendo o diâmetro do seu núcleo de 980 μm . Usualmente formadas de PMMA, as POF foram desenvolvidas na década de 1960. Por conta da sua maior atenuação, comparada com as fibras de sílica, ela não é muito usada em transmissão de dados a longas distâncias. Entretanto, em função da praticidade no manuseio e do baixo custo de fabricação, o desenvolvimento de sensores usando POFs tem sido amplamente pesquisado em laboratórios interessados em aplicações de sensores ópticos [1].

A facilidade para dobrar estas fibras e sua utilização como sensores em fluidos tem sido amplamente investigada. Em uma fibra dobrada as condições de propagação se alteram e alguns modos que se propagavam no núcleo da fibra reta são perdidos para a casca, ou seja, os modos mais elevados que atingem a interface núcleo/casca com um ângulo menor do que θ_c perdem sua energia para a casca. Este mesmo processo ocorre também com os modos de casca na interface da casca com a solução em que o sensor está imerso. Haverá então outro ângulo crítico em que os modos de casca que atingirem esta interface com ângulos superiores serão guiados. Alguns modos na curva atingirão a interface em ângulos menores do que o ângulo crítico, sendo perdidos para a solução. Desta forma parte da energia emitida na entrada da fibra será perdida, não atingindo a outra extremidade da fibra. Observa-se então que o índice de refração da amostra determina a energia que será guiada pela fibra para a sua saída.

Uma análise desenvolvida para uma fibra sem casca curvada [43], é apresentada na Figura 3.1, demonstrando a relação entre as potências de entrada e de saída como uma função do ângulo da curva da fibra.

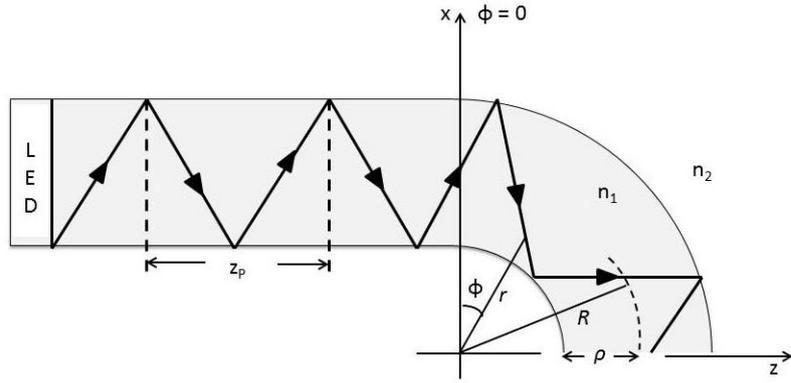


Figura 3.1: Fibra em curva com variação do ângulo (ϕ). ρ – raio do núcleo; n_1 – índice de refração da fibra; n_2 – índice de refração do meio externo; R – raio da curva; r – distância entre o centro da curva e a luz guiada; z_p – distância de meio período entre sucessivas reflexões na fibra esticada [11].

A atenuação da potência ao longo da fibra na direção (z) de propagação é descrita por

$$P(z) = P(0) \exp(-\gamma z) \quad (3.3)$$

onde γ é o coeficiente de atenuação determinado pela relação entre o valor médio do coeficiente de transmissão T , e pela distância de meio período entre sucessivas reflexões, denominado z_p [43] e [44].

$$\gamma = \frac{T}{z_p} \quad (3.4)$$

Por analogia, descreve-se a atenuação da potência ao longo da fibra curvada, em função do ângulo de curvatura ϕ por

$$P(\phi) = P(0) \exp(-\gamma \phi) \quad (3.5)$$

onde, também por analogia, o coeficiente de atenuação γ agora se relaciona com o ângulo ϕ_p (Figura 3.2) entre sucessivas cristas da onda, ou reflexões, em que há atenuação de potência. Assim

$$\gamma = \frac{T}{\phi_p} \quad (3.6)$$

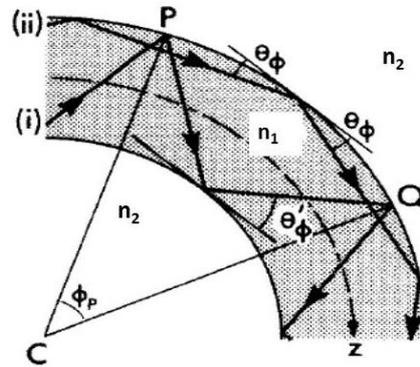


Figura 3.2: Destaque para os ângulos de reflexão dentro da fibra curvada. (i) reflexões alternando entre as superfícies externa e interna; (ii) reflexões na superfície externa; ϕ_p – ângulo entre duas reflexões consecutivas na superfície externa; θ_ϕ – ângulo de reflexão na superfície externa; θ'_ϕ – ângulo de reflexão alternando entre as superfícies interna e externa; z – direção de propagação da luz. n_1 – índice de refração interno; n_2 – índice de refração externo. Figura adaptada de [43]

Para simplificar a análise, consideram-se as reflexões na superfície externa da curva. Assim temos

$$\phi_p = 2\theta_\phi, \quad (3.7)$$

onde

θ_ϕ – ângulo entre o caminho do feixe luminoso e a tangente da interface externa da curva.

O ângulo θ_ϕ se relaciona com o ângulo de incidência θ através da expressão

$$\cos(\theta_\phi) = r_0 \frac{\cos(\theta)}{R + \rho}, \quad (3.8)$$

logo

$$\theta_\phi = \cos^{-1}\left(\frac{r_0 \cos(\theta)}{R + \rho}\right), \quad (3.9)$$

onde R é o raio da curva, ρ é o raio do núcleo e r_0 é o valor de r quando $\phi = 0$, de acordo com a Figura 3.1. Obtendo-se então T e ϕ_p pode-se calcular o coeficiente de atenuação γ da Equação (3.4).

A potência total P_s em função da curva é encontrada integrando-se todos os raios. Assim,

$$P_s(\phi) = P(0) \int_{R-\rho}^{R+\rho} dr \int_{-\theta_c(r)}^{\theta_c(r)} \exp(-\gamma\phi) d\theta. \quad (3.10)$$

O ângulo crítico aparece como função de r (distância entre o centro da curva e a luz guiada), pois na análise realizada o guia de onda plano considerado tem perfil gradual no núcleo, ou seja, $n_I(r)$. Para simplificação, pode-se considerar $\theta_c(r) = \theta_c$. Este estudo foi também aplicado para curvas com diferentes raios [44].

3.2 Característica da potência de saída com a variação do índice de refração do meio externo

A integral que define a potência de saída, Equação (3.10), depende do coeficiente de atenuação γ determinado pela razão entre T e ϕ_p segundo a Equação (3.6).

O coeficiente de transmissão (T) é definido por [45]:

$$T \equiv \alpha\beta \left(\frac{2}{\alpha + \beta} \right)^2, \quad (3.11)$$

onde

$$\alpha \equiv \frac{\cos \theta_t}{\cos \theta_i}, \quad (3.12)$$

e

$$\beta \equiv \frac{\mu_1 v_1}{\mu_2 v_2} = \frac{\mu_1 n_2}{\mu_2 n_1}, \quad (3.13)$$

onde:

θ_i e θ_t – ângulos de incidência e transmissão respectivamente.

μ_1 e μ_2 – permeabilidade dos meios 1 e 2 respectivamente.

v_1 e v_2 – velocidade da onda nos meios 1 e 2 respectivamente.

Reescrevendo-se α em função apenas do ângulo de incidência, tem-se:

$$\alpha = \frac{\sqrt{1 - \text{sen}^2 \theta_t}}{\cos \theta_i} = \frac{\sqrt{1 - \left[\left(\frac{n_1}{n_2}\right) \text{sen} \theta_i\right]^2}}{\cos \theta_i}, \quad (3.14)$$

e considerando-se $\mu_1 \approx \mu_2$, tem-se:

$$\beta = \frac{n_2}{n_1}. \quad (3.15)$$

Considerando-se que no caso de uma fibra sem casca de 1 mm a razão $r_0/(R+\rho)$ é aproximadamente um, tem-se da Equação (3.9) que

$$\theta_\phi = \cos^{-1}(\cos(\theta_i)). \quad (3.16)$$

Substituindo-se a Equação (3.16) na Equação (3.7) encontra-se ϕ_p .

A Equação (3.10) pode ser resolvida, sabendo-se que $\theta = \theta_i$, $\theta_c(r) = \theta_c$; Assim:

$$P_s(\phi) = P(0)[R + \rho - R + \rho][\theta_c + \theta_c] \exp(-\gamma\phi) \quad (3.17)$$

$$P_s(\phi) = 4P(0)\rho\theta_c \exp(-\gamma\phi). \quad (3.18)$$

Como no caso em estudo neste trabalho, $\phi = \text{cte} = \pi$, pode-se calcular a potência de saída em função do índice externo, $P(n_2)$. Assim,

$$P_s(n_2) = 4P(0)\rho\theta_c n_2 \exp[-\gamma n_2 \pi]. \quad (3.19)$$

Observa-se ainda que, para uma saída normalizada, precisa-se calcular a potência inicial, ou seja, quando n_2 é igual ao seu valor mínimo. Neste caso a potência de saída é máxima, igual a um. Assim

$$P(0) = P(n_{2_{min}}) \quad (3.20)$$

$$1 = 4P(n_{2_{min}})\rho\theta_c n_{2_{min}} \exp[-\gamma n_{2_{min}} \pi] \quad (3.21)$$

$$P(n_{2_{min}}) = \frac{1}{4\rho\theta_c n_{2_{min}} \exp[-\gamma n_{2_{min}} \pi]}. \quad (3.22)$$

Utilizando-se as Equações (3.7), (3.11), (3.14), (3.15) e (3.16) pode-se calcular numericamente um valor para γ . Sabe-se da Equação (3.1) que θ_c é função de n_1 e n_2 . Desta forma, considerando-se uma fibra sem casca, com $\rho = 0,5$ mm, onde n_1 é igual a 1,49 e n_2 (meio externo) varia entre 1,3329 e 1,3928, foi realizada uma simulação para avaliar o comportamento desta fibra com a variação do índice de refração do meio externo. Estas condições foram escolhidas pois simulam o sensor implementado neste trabalho. Os valores para n_2 foram os utilizados nos experimentos que serão apresentados no Capítulo 5. Na Figura 3.3 decorrente desta simulação, observa-se a influência da variação do índice de refração da amostra na avaliação quantitativa da luz guiada pela fibra curvada [11].

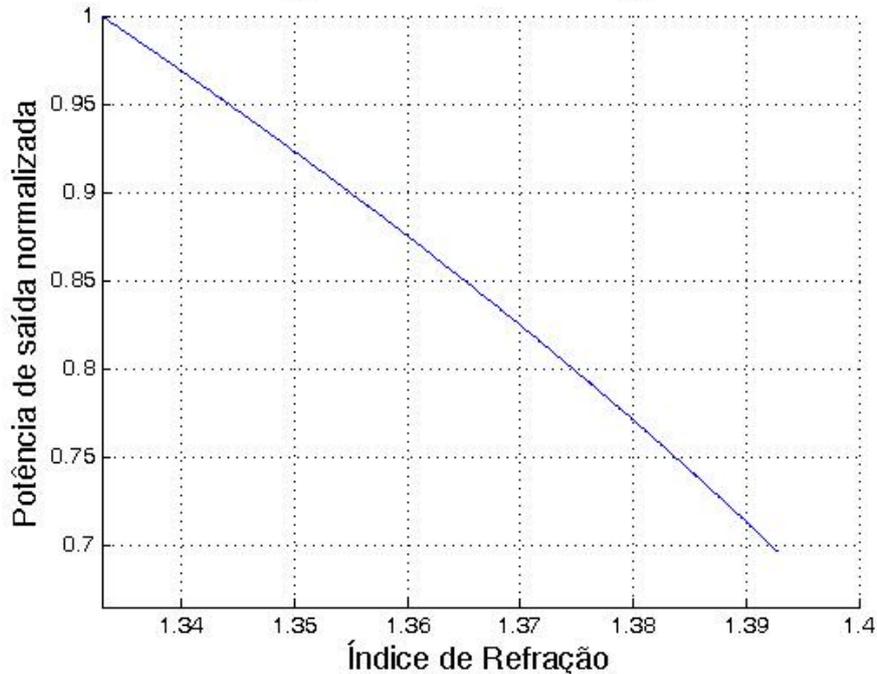


Figura 3.3: Característica de potência de saída normalizada com a variação do índice de refração do meio externo como fibra dobrada com ângulo fixo de 180°.

Observou-se uma atenuação de 30 % em relação à potência de entrada normalizada por conta da fibra estar curvada com um ângulo de 180°. As condições de implementação desta simulação foram simplificadas, apenas para a observação do fenômeno e validação das equações apresentadas. Entretanto, simulações com um programa específico para modelagem serão apresentadas no Capítulo 5.

3.3 Sensores à fibra óptica para refratometria

Para o escopo deste trabalho, os sensores têm a finalidade de atuar como imunossensores. Entretanto, em seu processo de funcionamento básico, eles determinam a variação do índice de refração da amostra. Esta determinação do índice de refração dos líquidos é uma das áreas da pesquisa de aplicações das fibras ópticas. Aumentar a precisão da medida dos índices de refração, utilizando sensores ópticos é um dos objetivos principais dessas pesquisas. Relatam-se resultados com incertezas de 2×10^{-3} e 5×10^{-3} para índices de refração entre 1,30 e 1,59, sendo esta uma precisão suficiente para as indústrias que produzem líquidos como óleos, detergentes e sucos [5].

O conhecimento aprofundado das propriedades físicas da fibra é indispensável para o avanço da pesquisa em sensores. O estudo do campo evanescente, a relação entre

os índices do núcleo e da casca da fibra, os efeitos do *taper* (processo de afinamento da fibra) e da curva na fibra são temas constantemente investigados em pesquisas [46]. A variação destas propriedades e seus efeitos como a mudança da potência de saída, ou do espectro da luz guiada são alguns dos itens estudados no desenvolvimento desses sensores.

Em outro estudo observou-se também que na região de índice de refração entre 1,300 e 1,450 a curva de resposta é praticamente linear, sendo isto uma facilidade para a produção de sensores que trabalhem nesta região próxima ao índice de refração da água pura [47].

As fibras plásticas apresentam maior facilidade para serem dobradas e assim utilizadas como sensores na medida de índice de refração. Esta técnica de fabricação de sensores de índice de refração com a fibra curvada foi utilizada também na produção de uma micro fibra de plástico (m-POF) com diâmetros entre 20 μm e 40 μm . Foram realizadas pelos autores simulações que comprovaram a eficiência do sensor em forma de U [48]. Além da medida de índice de refração, este sensor foi utilizado para medir variações de temperatura entre 10 $^{\circ}\text{C}$ e 70 $^{\circ}\text{C}$, apresentando excelentes resultados [49].

Ainda sobre a técnica de curvar a fibra, encontra-se na bibliografia outro sensor utilizando uma fibra POF de 1 mm moldada em forma de U com raio de curvatura de 5,0 mm [50]. Esta foi polida num ângulo de 60°, alcançando este polimento uma profundidade de até 600 μm . A sensibilidade normalizada deste sensor atinge uma atenuação de 40 % da potência óptica transmitida, em medidas feitas em índices de refração de 1,33 a 1,40, o que é equivalente aos trabalhos anteriores realizados no LIF.

A análise da sensibilidade em sensores em forma de U com a fabricação de *tapers* tem sido estudada também em fibras convencionais de sílica. Num estudo realizado, fibras afinadas de 125 μm até 20 μm demonstraram que a potência óptica começa a cair a partir de 70 μm de diâmetro, produzindo uma atenuação ainda mais rápida para os afinamentos entre 30 μm e 20 μm de diâmetro desta fibra [51].

Estudos demonstram que a variação do raio da curva implementada na fibra e a variação do diâmetro da fibra através da produção de *tapers* ou com fibras de espessuras diferentes, aumentam a sensibilidade do sensor em forma de U [52], [26]. Estas modificações serão também investigadas no presente trabalho através de modelagem computacional.

Visando-se aumentar a sensibilidade de um sensor em forma de U feito com fibra óptica de sílica, foram acrescentadas diferentes formas de curvas na fibra,

formando sensores em forma Espiral e Zigue-zague [53]. Os resultados apresentados para os sensores U e Espiral foram similares, sendo capazes de avaliar concentrações de etanol e metanol em água a 10 %, com variações a cada 1 %. Já o sensor Zigue-zague avaliou as mesmas concentrações com uma sensibilidade 10 vezes maior. Estas configurações de sensores Espiral e Zigue-zague serão avaliadas para a fibra POF no presente trabalho através de modelagem computacional.

3.4 A morfologia da *Escherichia coli* e o imunossensor

As bactérias são invisíveis ao olho humano, sendo medidas em micrômetros (μm). Elas variam de tamanho, dependendo da espécie, mas a maioria tem diâmetro ou largura entre 0,5 μm e 2,0 μm aproximadamente. Elas se apresentam em três formas:

- Cocos: são esféricas ou elípticas;
- Bastonetes ou bacilos: são cilíndricas, com extremidade reta ou arredondada;
- Espirilos: são em forma de hélice, saca-rolhas, ou espiralar.

As cilíndricas podem variar de 2 a 3 μm de comprimento. Já as espiraladas podem chegar a 100 μm de comprimento [54].

Escherichia coli, bactéria escolhida como antígeno neste trabalho, tem forma de bastonete e habita constantemente o intestino humano. A presença da *E. coli* em água pode indicar contaminação fecal. A doença mais comum causada pela *E. coli* é a infecção urinária, podendo também estar envolvida em septicemias, meningites e outros tipos de infecções, com maior ocorrência em crianças e mulheres grávidas [55].

Considerando-se que o sensor desenvolvido no presente trabalho utiliza uma fibra POF de 1,0 mm de diâmetro (D_s) e o comprimento (L_s) da parte sensível é de aproximadamente 10 mm, a área útil do sensor (A_s) será:

$$A_s = \pi \cdot D_s \cdot L_s = \pi \cdot 1,0 \cdot 10 = \pi \cdot 10^1 \text{ mm}^2 \quad (3.23)$$

Considerando-se o tamanho médio da bactéria *E. coli* em forma bastonete, como sendo 1,0 μm de diâmetro (D_b) e o comprimento (L_b) de 2,0 μm podemos estimar a área

de contato da bactéria (A_b) com a fibra, como sendo metade de sua área total, já que apenas um lado da bactéria se fixará a fibra, considerando-se também todas as bactérias deitadas. Assim:

$$A_b = \frac{\pi \cdot D_b \cdot L_b}{2} = \frac{\pi \cdot 1,0 \cdot 2,0}{2} = \pi \mu m^2 = \pi \cdot 10^{-6} mm^2 \quad (3.24)$$

Desta forma, estima-se então que o número máximo (N) de bactérias para cobrir a área sensora será da ordem de:

$$N = \frac{A_s}{A_b} = \frac{\pi \cdot 10^1}{\pi \cdot 10^{-6}} = 10^7 \text{ bactérias} \quad (3.25)$$

O becker utilizado nos experimentos deste trabalho contém 5 ml da amostra. Assim, se um sensor imerso numa amostra com 10^4 UFC/ml capturar todas as bactérias da amostra, ainda não formará um filme sobre a fibra. Entretanto, espera-se que ele seja capaz de ser sensível para identificar concentrações ainda mais baixas, capturando um pequeno número de bactérias.

Capítulo 4

Metodologia e montagem experimental

4.1 Protocolo de remoção da casca da POF

O procedimento de remoção da casca da fibra foi aplicado de acordo com a literatura de referência [56]. Um lenço de papel para lentes, tamanho de 30 mm², foi dobrado em dois. Aplicou-se aproximadamente 0,2 ml de acetona 100 %, sendo o suficiente para saturá-lo. Feito isso, o lenço foi friccionado cuidadosamente por 10 segundos na região em que se quer remover a casca. A fibra tornou-se bastante frágil. Para remover o excesso da acetona, aplicou-se a mesma quantidade de água destilada sobre o mesmo tecido, mantendo-se levemente a fricção na mesma região. Neste instante, percebeu-se a casca da fibra sendo removida. A região então foi lavada com álcool isopropílico para garantir que o núcleo ficasse livre de impurezas.

Observou-se com o auxílio de um microscópio óptico que a região do núcleo não é afetada (Figura 4.1). Caso ainda houvesse algum vestígio de casca, o processo seria repetido, sempre com o cuidado de não arranhar o núcleo. Esse procedimento foi realizado na fibra antes desta ser dobrada no processo de fabricação.

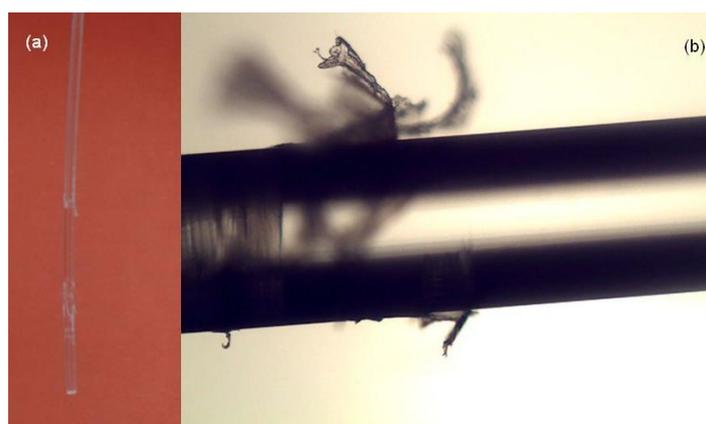


Figura 4.1: (a) POF descascada; (b) Ampliação da área descascada. Observa-se parte da casca solta na interface da região com casca/sem casca.

4.2 Fabricação dos sensores POF

Considerando-se os estudos anteriormente apresentados, o sensor foi fabricado utilizando-se o equipamento desenvolvido no LIF (Figura 4.2 (a)). Este equipamento já havia sido utilizado em trabalhos anteriores do laboratório [11]. A fibra é colocada no molde em forma de U. Logo após, a fibra foi aquecida por um jato de ar quente, durante 25 segundos. Aguardando-se 10 segundos para resfriamento, a fibra permaneceu na forma definida. Esta técnica é conhecida como *flame-brush*. No caso das fibras plásticas, apenas um jato de calor é suficiente para o derretimento na forma do molde. As extremidades da fibra foram então cortadas, numa distância de aproximadamente 2,0 cm e suas pontas clivadas e polidas para o acoplamento adequado da luz no guia. A Figura 4.2 (b) mostra uma ampliação da área onde os sensores foram fabricados e a Figura 4.2 (c) mostra um sensor fabricado em forma de U.

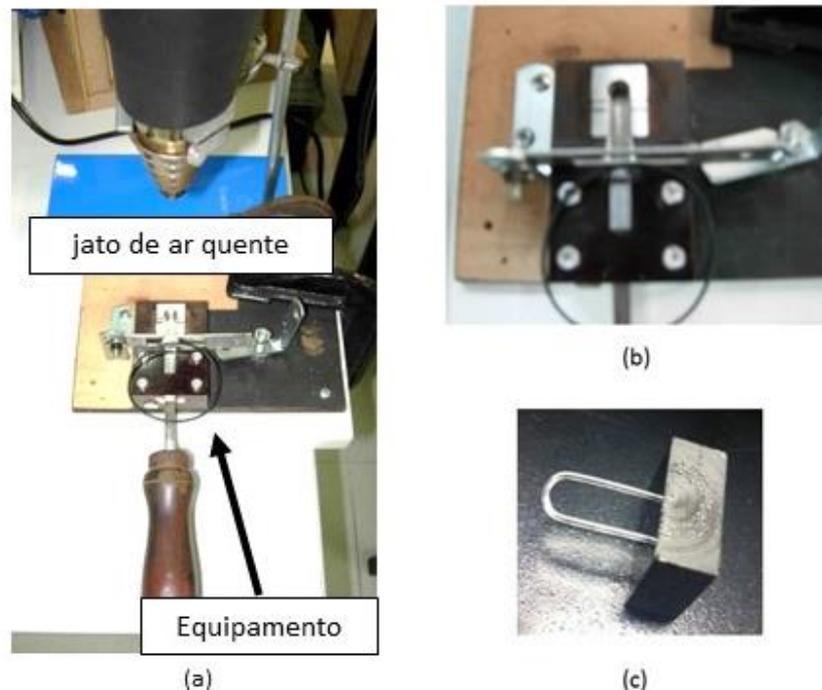


Figura 4.2: (a) Equipamento desenvolvido para produzir sensores em forma de U. (b) Ampliação da área onde os sensores são curvados. (c) Sensor fabricado em forma de U. Figura adaptada de [2].

O dispositivo eletrônico utilizou um LED [57] e um fotodiodo [58]. Para fixação de ambos junto à fibra, foi utilizado um suporte inicialmente desenvolvido, conforme a Figura 4.3 (a). Ele acopla o LED na entrada do sensor e o fotodiodo na saída do sensor.

Para as medidas realizadas pelo imunossensor, tornou-se necessário eliminar a influência da variação de outros parâmetros que pudessem mascarar os resultados, como a turbidez da amostra, por exemplo. Desta forma, passou-se a utilizar um sensor de

referência idêntico, fabricado sobre as mesmas condições, que trabalhou em paralelo com imunossensor. O sensor de referência não passou pelo processo de funcionalização para capturar as bactérias. Assim, quando ele foi exposto às mesmas condições durante o experimento, ou seja, sendo imerso na amostra paralelamente ao sensor funcionalizado, ele não capturou as bactérias. Caso este sensor de referência demonstrasse alterações elas apontariam variações de parâmetros da amostra independentes da captura de bactérias. A diferença dos sinais emitidos pelos dois sensores pode ser observada simultaneamente.

Um novo suporte foi confeccionado para a utilização do sensor de referência em paralelo, como mostra a Figura 4.3 (b).

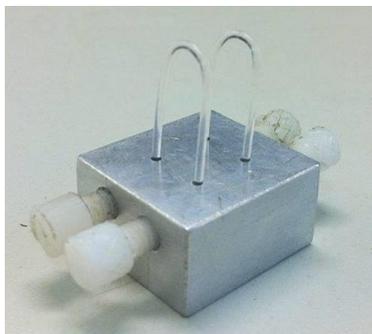
A variação da potência óptica de saída é um parâmetro importante no processo de medição. Qualquer mudança na posição do sensor em relação ao fotodiodo ou ao LED podem alterar a leitura do valor da tensão de saída do sistema, ocasionando num resultado falso. Assim, neste novo suporte, foram introduzidos parafusos de fixação da fibra, garantindo um melhor ajuste e imobilização do sensor, conforme mostra a Figura 4.3 (c). A placa do circuito com o LED e o fotodiodo, Figura 4.3 (d), foi aparafusada no suporte.



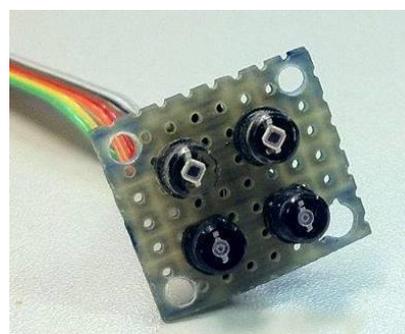
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.3: (a) Suporte simples para o LED, fotodiodo e sensor. (b) Suportes duplo para dois LEDs, dois fotodiodos e parafusos de fixação para dois sensores. (c) vista do suporte duplo com sensores. (d) placa com LEDs e fotodiodos.

O LED com comprimento de onda de 880 nm e o fotodiodo utilizados foram escolhidos observando-se um melhor casamento entre o comprimento de onda emitido pelo LED e o capturado pelo fotodiodo. Comparando-se o espectro do LED, Figura 4.4 (a), com o espectro do fotodiodo, Figura 4.4 (b), observa-se que o máximo da intensidade luminosa tanto no LED quanto no foto encontram-se numa mesma região.

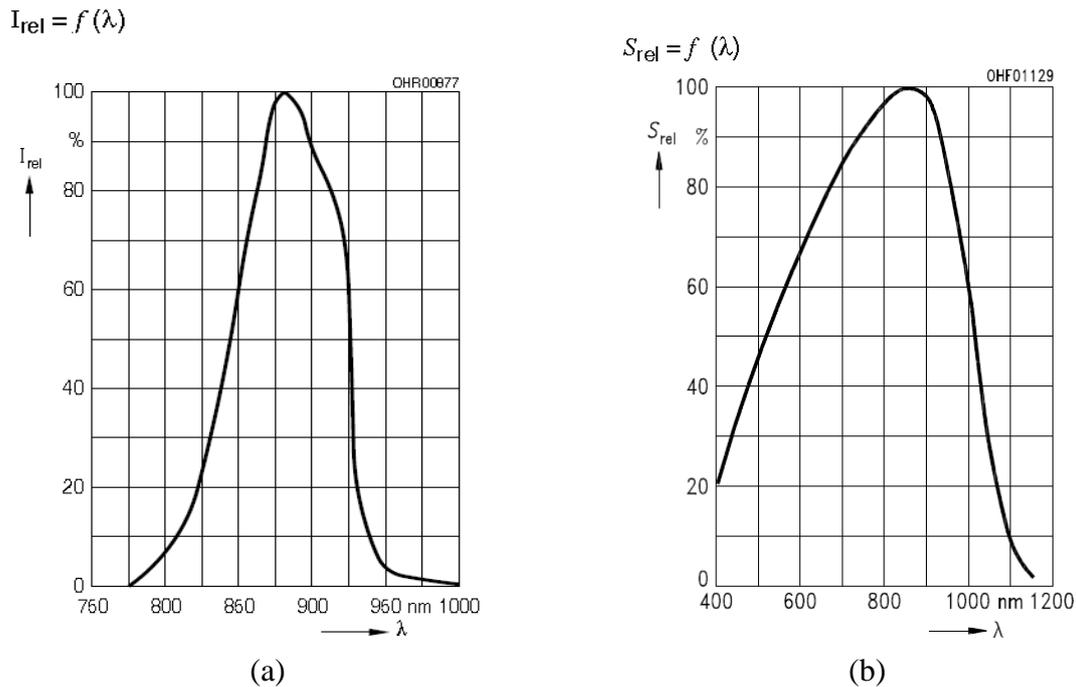


Figura 4.4: (a) gráfico da intensidade espectral relativa emitida pelo LED (I_{rel}) por comprimento de onda (λ) [57]. (b) gráfico da sensibilidade espectral relativa do fotodiodo (S_{rel}) em função do comprimento de onda (λ) [58].

Durante o projeto, foram também realizados experimentos com uma fibra POF de 250 μm de diâmetro. Foram moldados raios de curvatura de 4,0 mm e 1,5 mm, utilizando-se a mesma técnica *flame-brush*. No caso do raio de 1,5 mm foi utilizado um parafuso com este raio para moldar a curvatura (Figura 4.5 (a)). A Figura 4.5 (b) mostra uma ampliação da fibra em volta do parafuso. Para fixação desta POF de 250 μm de diâmetro no suporte foram adaptados guias de agulhas visando um melhor ajuste dos sensores. A Figura 4.5 (c) mostra o sensor fixado no suporte com as agulhas.

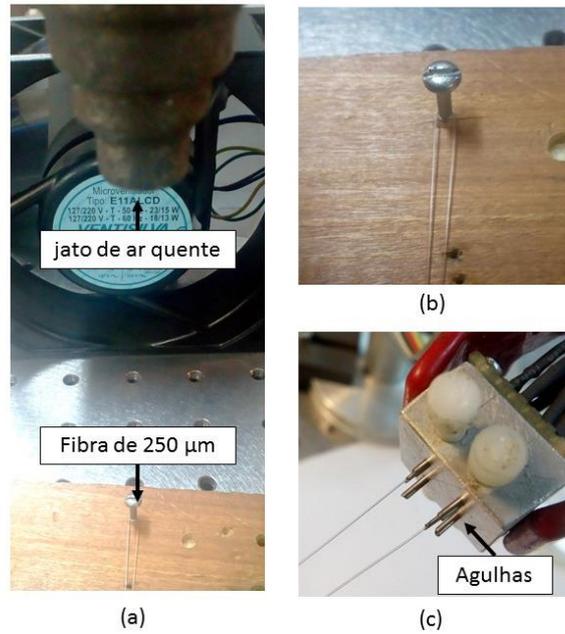


Figura 4.5: (a) Fabricação do sensor com fibra de 250 μm . (b) Ampliação da imagem do sensor sendo moldado pelo parafuso. (c) Sensor com fibra de 250 μm , fixado ao suporte com o auxílio de agulhas.

4.3 A configuração eletrônica utilizando o Amplificador *Lock-in*

Considerando-se que o presente trabalho se propõe a prosseguir o desenvolvimento e implementação dos sensores para refratometria e imunossensores no LIF [10], [11], alguns resultados da utilização do sistema com o Amplificador *Lock-in* serão apresentados nesta Tese para comparação. Desta forma a Figura 4.6 mostra um diagrama de blocos do experimento realizado para medição do índice de refração com os sensores à fibra óptica, utilizando-se o Amplificador *Lock-in*.

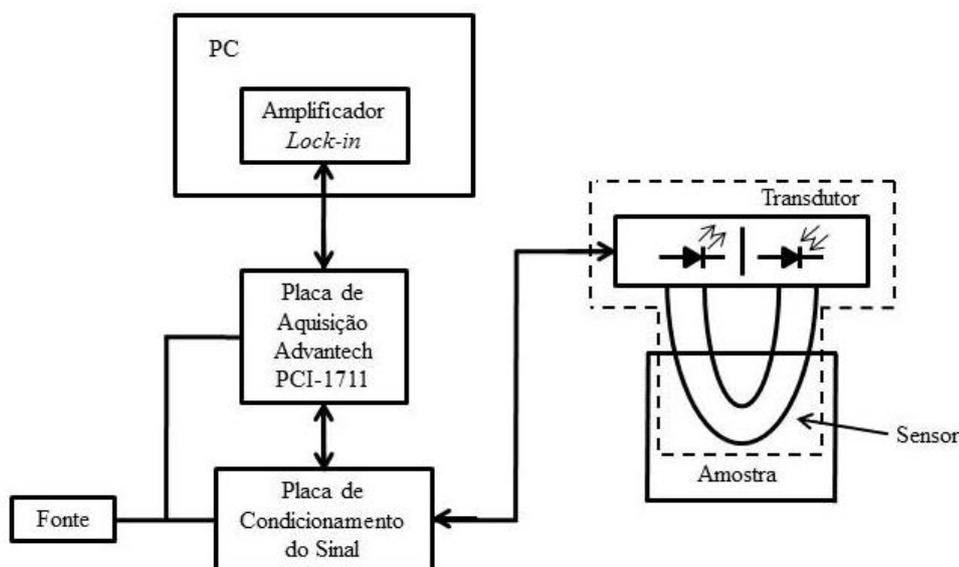


Figura 4.6: Diagrama de blocos do experimento realizado para medição do índice de refração com os sensores a fibra óptica utilizando o Amplificador *Lock-in* [11].

No *setup* implementado, um LED acoplado à fibra recebe um sinal senoidal gerado pelo Simulink[®], simulador do Matlab[®] que também captura o sinal de um fotodiodo colocado do lado oposto da fibra. O Simulink[®] se comunica com o circuito através de uma placa de aquisição de sinais (PCI 1711 da Advantech) [59]. Este sinal é rastreado e recuperado sem interferências por um Amplificador *Lock-in* implementado no Simulink[®].

No Amplificador *Lock-in* o sinal de entrada proveniente do sistema físico é amplificado e um sinal de referência é fornecido ao amplificador como uma tensão na mesma frequência do sinal a ser analisado, tendo também uma fase fixa em relação ao sinal de estudo. Para isso, normalmente, os sinais de entrada e referência são provenientes da mesma fonte. No Amplificador *Lock-in*, diferente dos voltímetros, o ruído não é retificado e aparece na saída como uma flutuação AC. Assim, o sinal de entrada de interesse, uma vez convertido em nível DC, pode ser separado do ruído por meio do uso de um filtro passa baixa simples. Desta forma a leitura do sinal de saída no instrumento não é afetada pela presença de ruídos no sinal de entrada.

A configuração atual, utilizando-se a plataforma Arduino, apresentou resultados compatíveis com o Amplificador *Lock-in*, sendo, porém, mais simples e portátil, atendendo melhor aos objetivos futuros deste projeto.

4.4 As configurações eletrônicas desenvolvidas para a plataforma Arduino

Durante o desenvolvimento do sistema eletrônico, dois circuitos eletrônicos foram desenvolvidos, visando medidas mais estáveis e precisas. Na primeira configuração, mostrada na Figura 4.7, um LED é alimentado por uma fonte de corrente controlada pela plataforma Arduino. A configuração eletrônica mantém a corrente em 20 mA, proporcionando uma operação estável do LED. Assim, a luz recebida por um fotodiodo diminui de acordo com o diferente índice de refração do meio externo, ou de acordo com a quantidade de bactérias capturadas pelo anticorpo fixado no imunossensor. A saída do circuito receptor, que contém o fotodiodo e um amplificador, retorna o sinal para o Arduino, sendo o sinal lido simultaneamente por um multímetro digital (Tektronix DMM 4050). No Arduino a tensão de saída lida é a média dos 100 últimos valores medidos. Já no multímetro é feita a média de 50 valores de tensão medidos. Desta forma podemos avaliar a incerteza medida de forma diferente e compará-las. Este novo circuito implementado com o Arduino utiliza tensão contínua de 5 V, diferente do sistema com Amplificador *Lock-in* que precisa da tensão alternada de 12 V. A Figura 4.8 mostra o circuito eletrônico analógico, de interface com o driver do LED e condicionamento de sinal do fotodiodo e seus respectivos componentes.

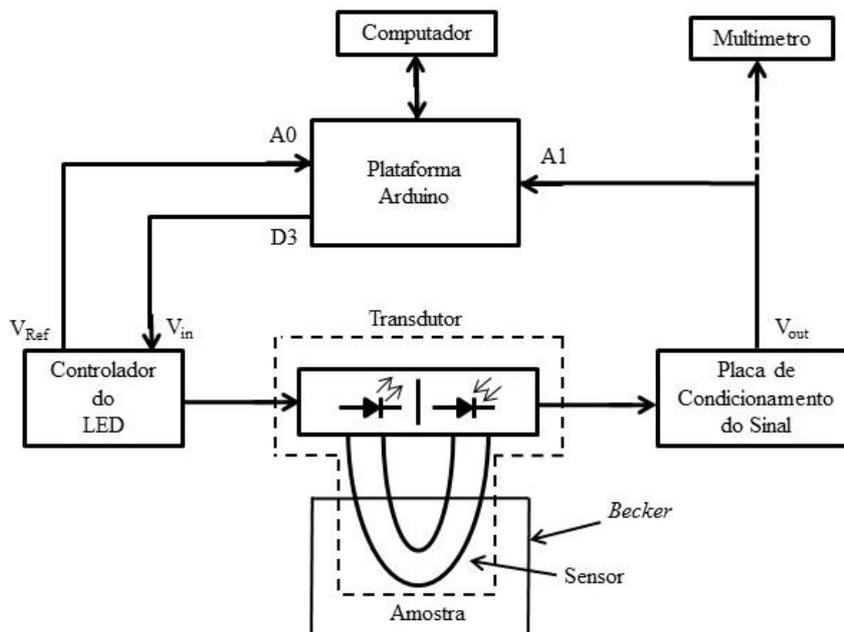


Figura 4.7: Diagrama de blocos do setup implementado inicialmente com a plataforma Arduino

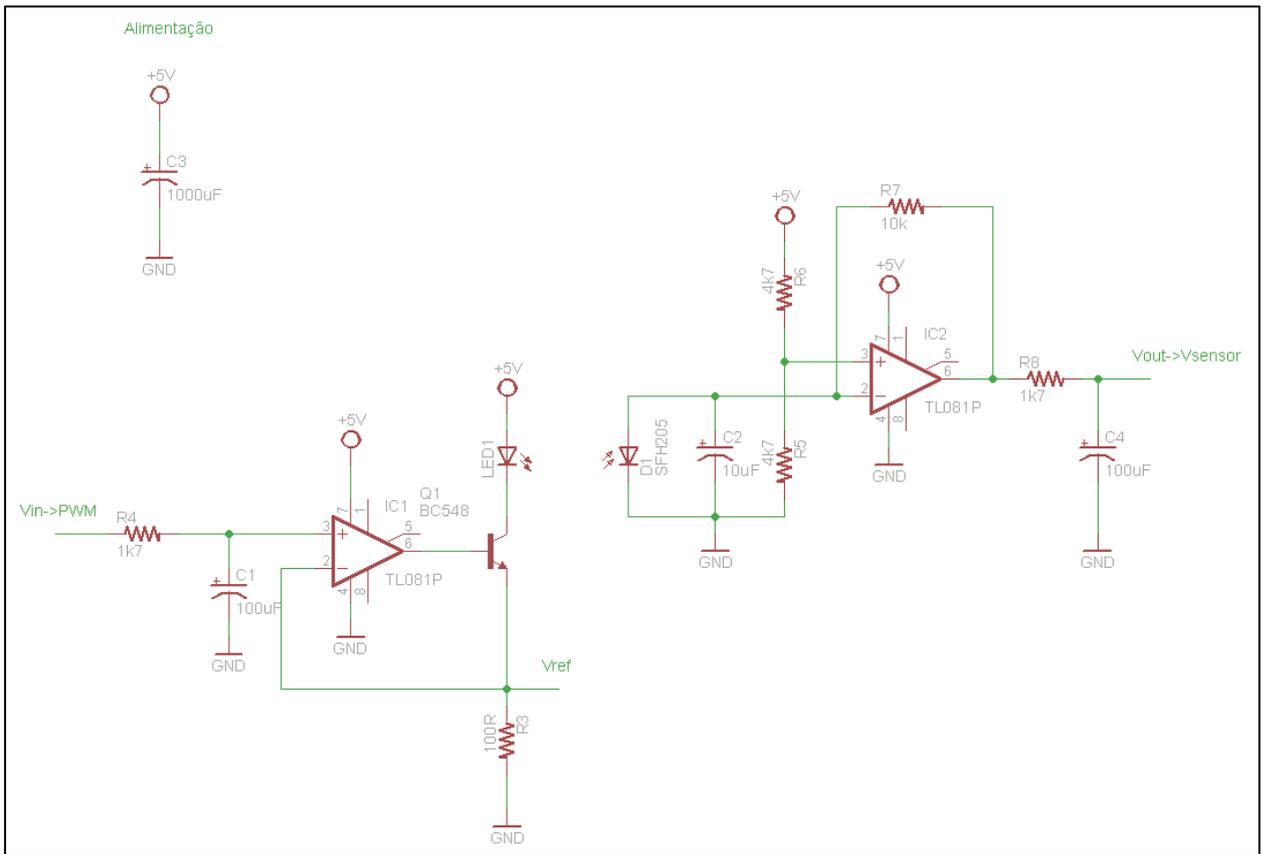


Figura 4.8: Circuito de entrada para o conversor A/D (condicionador de sinal), e a saída do conversor D/A com PWM (driver).

A Figura 4.9 mostra a segunda configuração desenvolvida para medição, utilizando um *setup* com sensor de referência. Esta foi desenvolvida para comportar o sensor não funcionalizado como referência. Conforme apresentado anteriormente, este sensor, teoricamente, não deve sofrer alterações em sua saída durante as medidas realizadas com a amostra de bactérias. Desta forma, caso ele sofra alguma alteração pode-se considerar que a solução sofreu a mudança de seu índice de refração, independente da captura dos micro-organismos.

Para um correto funcionamento do sistema, ambos os sensores devem ser imersos em solução salina para calibração. Após a estabilização dos valores das tensões de saída, os sensores são então imersos nas soluções com concentrações específicas de bactérias, iniciando-se assim o processo de medição. O circuito implementado para condicionamento do sinal e *drivers* é mostrado na Figura 4.10.

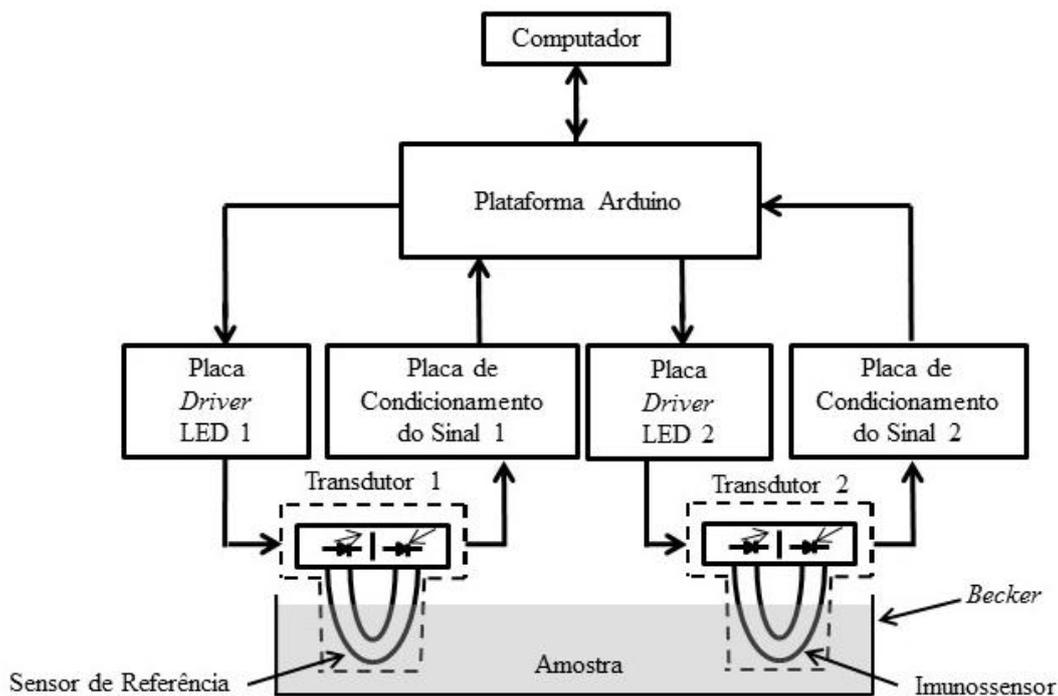


Figura 4.9: Diagrama de blocos do setup implementado com sensor de referência.

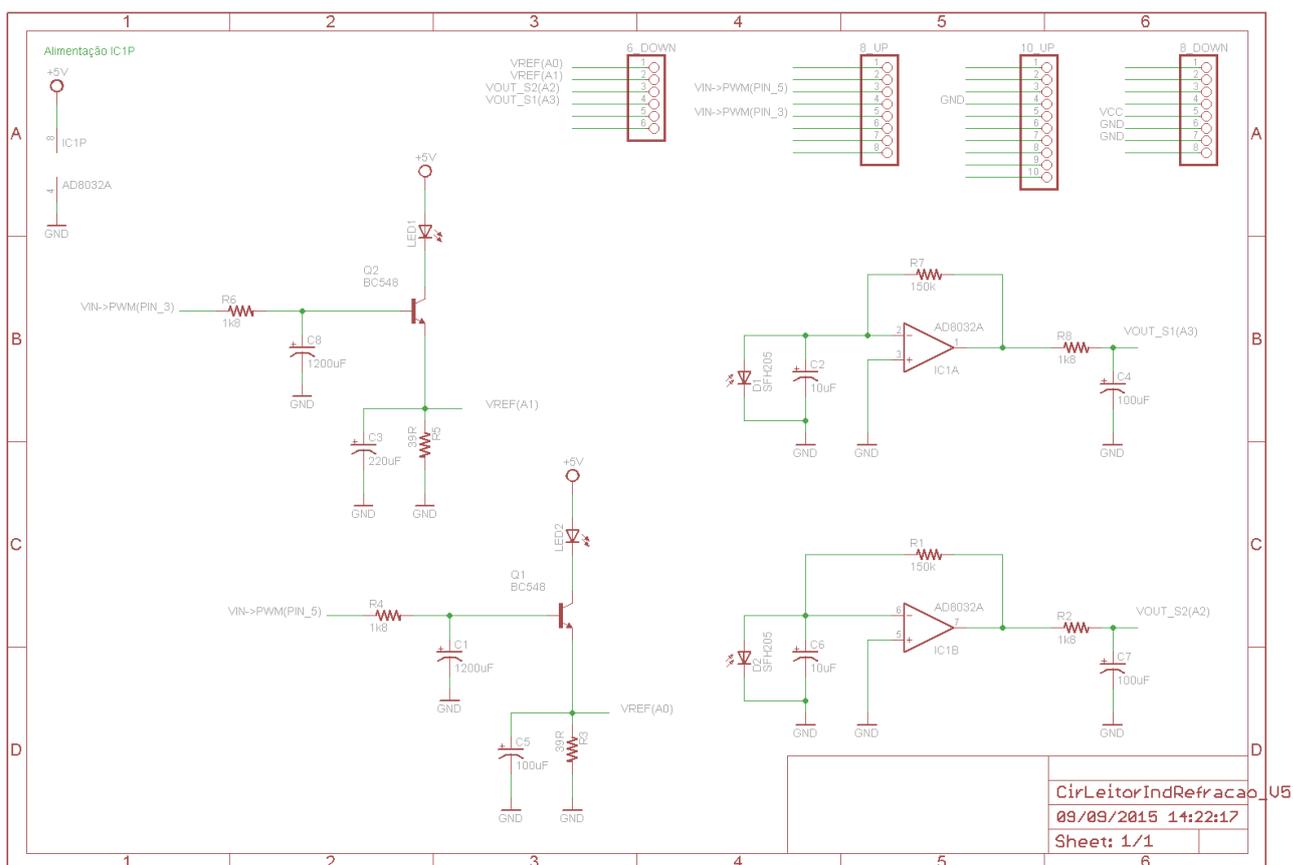


Figura 4.10: Circuito de condicionamento do sinal e drivers para a plataforma Arduino

Inicialmente o programa mostra na tela as opções para “Calibrar o Sistema”, “Realizar medidas”, “Parar as medidas ou a calibração” ou “Alterar o intervalo entre as medidas”, conforme apresentado na Figura 4.11.

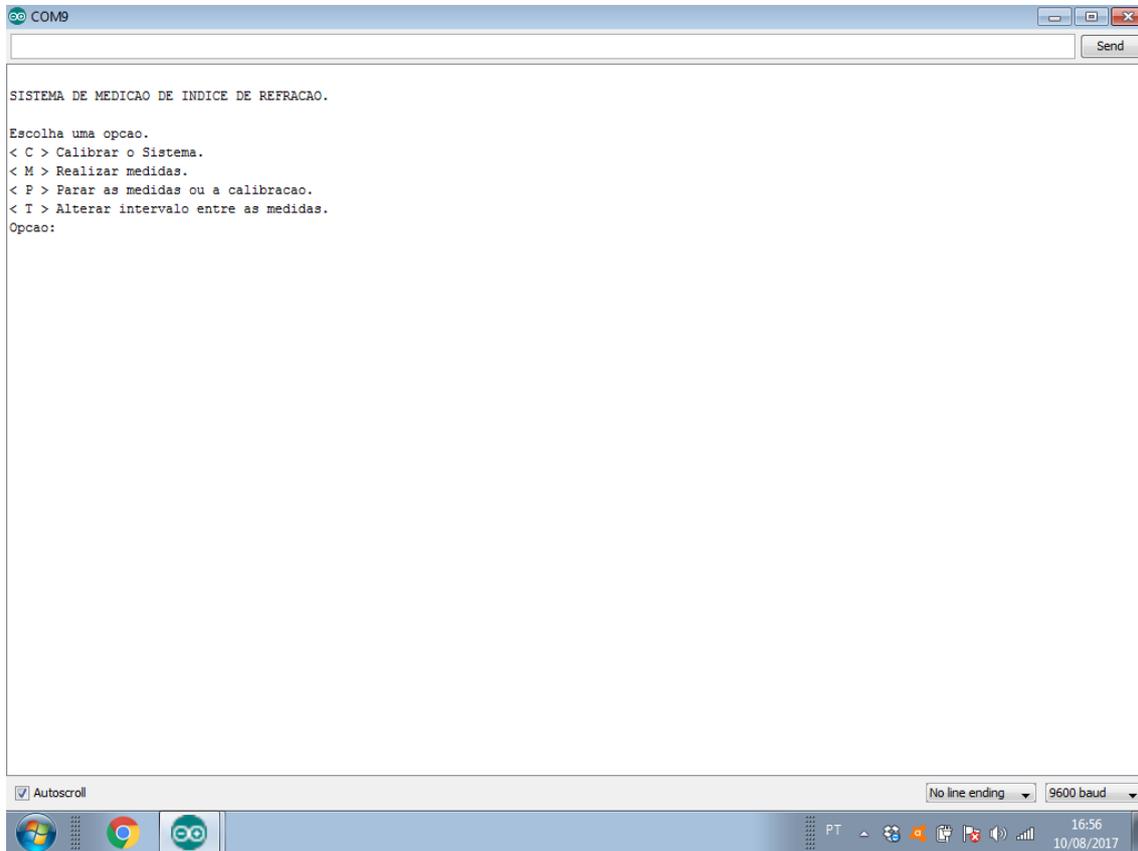


Figura 4.11: Tela apresentada pela interface da plataforma Arduino

No processo de calibração as correntes nos LEDs são ajustadas até que os valores inteiros provenientes do conversor analógico-digital (A/D) estejam de acordo com o valor 4,0 V, definido como referência para a saída de ambos os sensores. A incerteza da medida foi também previamente definida no programa com o valor em +/- 5 mV. Quando estes valores são alcançados o processo de calibração é encerrado. Após a calibração, inicia-se o processo de medição do imunossensor com os dados sendo coletados automaticamente a cada minuto. As medidas podem ser encerradas a qualquer momento. Nos experimentos realizados foram aguardados 40 minutos. A Figura 4.12 mostra o sistema em funcionamento. Um fluxograma do processo de calibração e medição do sistema é mostrado na Figura 4.13 para facilitar a compreensão do processo. O programa completo encontra-se no Anexo A.

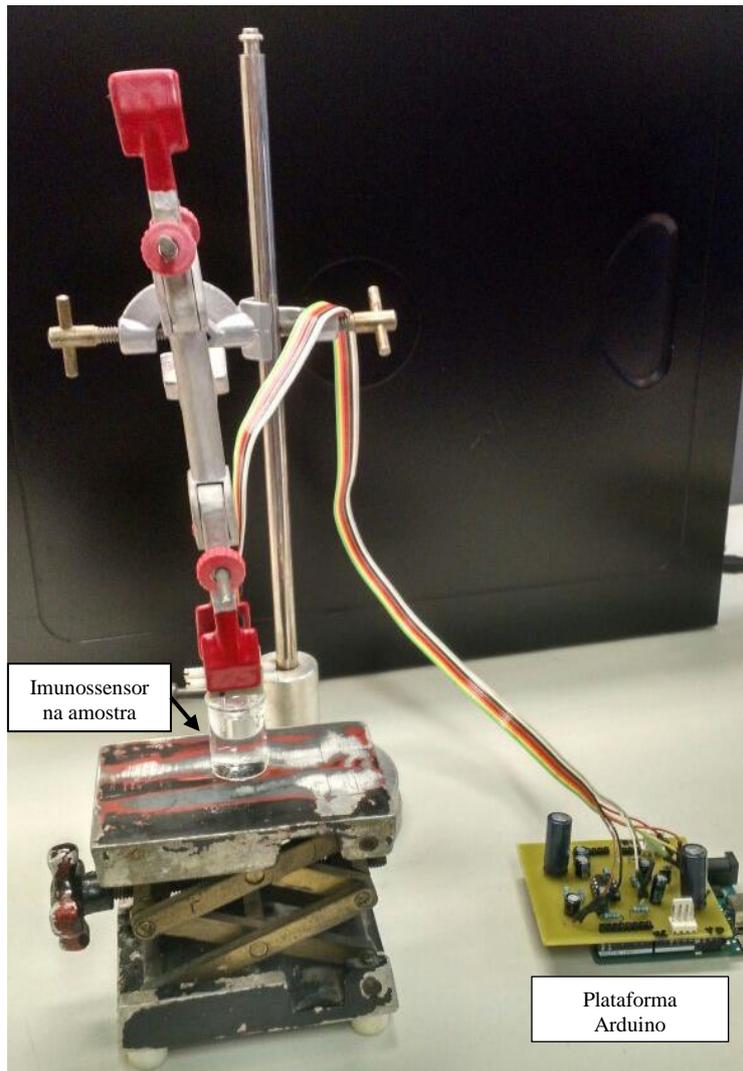


Figura 4.12: Sistema de medição com a plataforma Arduino em funcionamento.

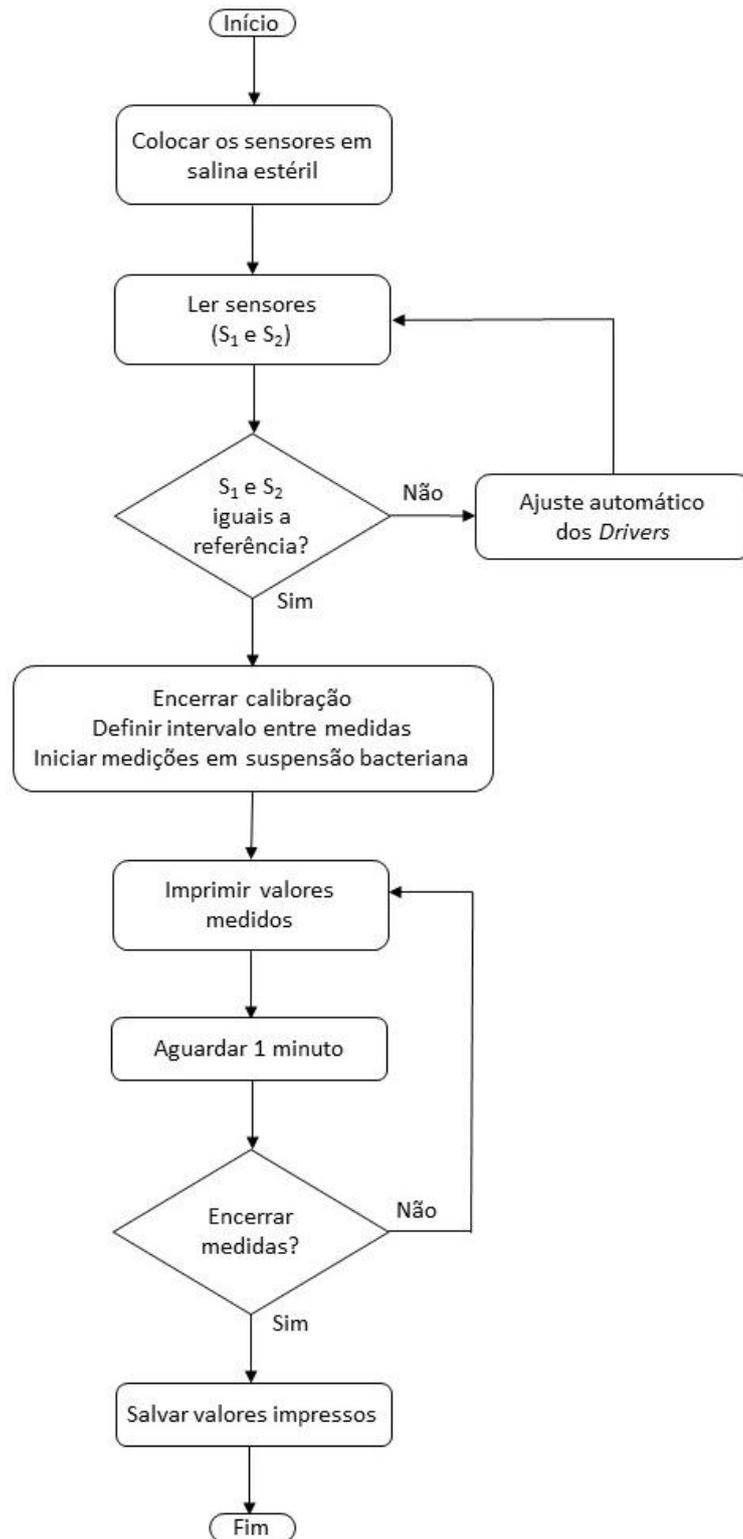


Figura 4.13: Fluxograma do processo de calibração e medição com o sistema.

4.5 Metodologia de análise da incerteza da medição e sensibilidade

Os dados coletados durante os experimentos foram modelados matematicamente e avaliados de acordo com o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM 2008) [60], utilizada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Este procedimento pode ser resumido através dos seguintes passos: 1) definição do mensurando; 2) diagrama causa-efeito; 3) avaliação da incerteza - padrão; 4) cálculo dos coeficientes de sensibilidade; 5) componentes de incerteza e 6) cálculo da incerteza-padrão combinada. Estes passos já foram utilizados e exemplificados no projeto inicial deste sensor para medição de índice de refração [11]. A avaliação e interpretação dos valores gerados passo a passo possibilita a identificação das fontes que causam maior impacto no processo.

Para uma análise inicial do funcionamento dos sensores, os dispositivos foram calibrados utilizando-se soluções de sacarose preparadas com água destilada estéril. Estas soluções permitem avaliar a sensibilidade, precisão e repetibilidade de medição dos sensores. As concentrações de sacarose fabricadas com 15 %, 25 %, 30 %, 45 % e 52 % produzem índices de refração de 1,35, 1,36, 1,37, 1,38 e 1,39, respectivamente, todos medidos por um refratômetro Abbe comercial [11]. Estes valores de índice de refração foram escolhidos por representarem pontos no intervalo entre água pura ($n = 1,33$) e uma pasta de bactéria ($n = 1,39$) determinados num experimento realizado anteriormente no LIF. Durante o procedimento de calibração, cada sensor foi sequencialmente imerso nas soluções calibradas, e 10 conjuntos de medições foram registradas. Em seguida, os parâmetros de incerteza foram avaliados de acordo com o GUM 2008. A sensibilidade (S) é verificada pela primeira derivada da curva em relação ao índice de refração (n), dada por:

$$S = \frac{\partial V_{out}}{\partial n} \quad (4.4)$$

4.6 Protocolos químico e biológico utilizados na funcionalização e imobilização do imunossensor

O primeiro protocolo utilizado para a ligação de anticorpos foi adaptado de acordo com a metodologia proposta pela literatura [33]. Os sensores foram limpos com

isopropanol (99 %) durante 5 min, e depois completamente lavados com água destilada estéril. As fibras foram incubadas numa solução de hexametilenodiamina (HMDA) a 10 % preparada com 100 μ M de tampão borato pH 11,5 durante 2 horas a 30 °C. Depois de lavados duas vezes com água destilada, os sensores foram secos durante 2 horas a 30 °C. Para ativar a aminação, as fibras foram colocadas em uma solução de glutaraldeído a 2,5 % preparado em tampão de fosfato pH 8,0 com 0,1 M durante 2 horas a 30 °C. Após este tratamento, as fibras foram lavadas vigorosamente três vezes com tampão de fosfato de pH 8,0 com 0,1 M, seguido por secagem durante a noite toda a 30 °C.

Posteriormente, as fibras foram incubadas com proteína A estafilocócica (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 0,05 mg/ml, diluída em tampão de carbonato de sódio (Na_2CO_3) pH 9,5 durante 1 hora a 30 °C. Para evitar a ligação não específica durante o processamento, os locais de ligação foram bloqueados por tratamento com albumina de soro bovino a 0,1 % em solução salina a 0,85 %, pH 7,0. O bloqueio foi realizado durante 1 hora a 30 °C sob agitação. Subsequentemente, as fibras foram lavadas três vezes em solução salina a 0,85 %, pH 7,0. Finalmente, as fibras tratadas foram deixadas em contato com 600 μ L de suspensão de anticorpos *anti-E. coli* O55 (0,1 mg/ml) obtido comercialmente (AbD Serotec, UK), durante 4 horas a 30 °C e lavadas três vezes em solução salina a 0,85 %.

Visando-se uma melhor funcionalização do PMMA, após estudos e a realização de alguns experimentos, uma nova etapa foi incluída neste protocolo experimental (segundo protocolo) [26]. Antes da aminação pela solução de HMDA, solubilizou-se o PMMA em ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, na proporção molar 1:100, à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida a 60 °C por 2 horas, com a finalidade de obter uma hidrólise total do PMMA. A etapa do HMDA também foi alterada para 24 horas. A Figura 4.14 mostra um fluxograma de todo o processo para facilitar a compreensão de cada etapa.

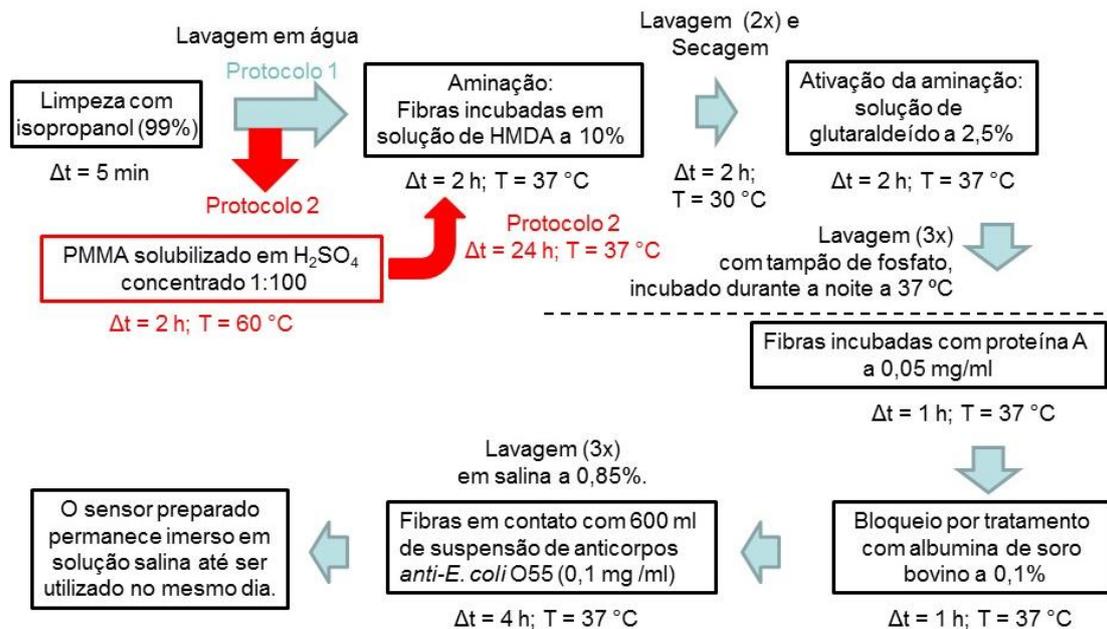


Figura 4.14: Fluxograma do protocolo biológico utilizado na funcionalização do sensor.

Cepas de *Escherichia coli* EPEC 055 foram mantidas em cultura de trabalho a 4 °C em ágar triptona de soja (TSA- Interlab, SP, Brasil). Para uma suspensão inicial de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml de *Escherichia coli*, um inóculo bacteriano foi transferido para um tubo contendo solução salina de NaCl 0,9% estéril e a turbidez foi comparada com a escala 0,5 de McFarland. Suspensões subsequentes foram preparadas em diluições seriadas de 1:10, obtendo-se assim concentrações de bactérias de 10^6 e 10^4 UFC/ml. A Figura 4.15 ilustra o processo de diluição das concentrações de bactérias.

Os parâmetros biológicos relacionados ao anticorpo e a bactéria que verificam suas atividades, assim como a observação da fase, temperatura, pH e possíveis contaminações, foram monitorados e avaliados periodicamente.

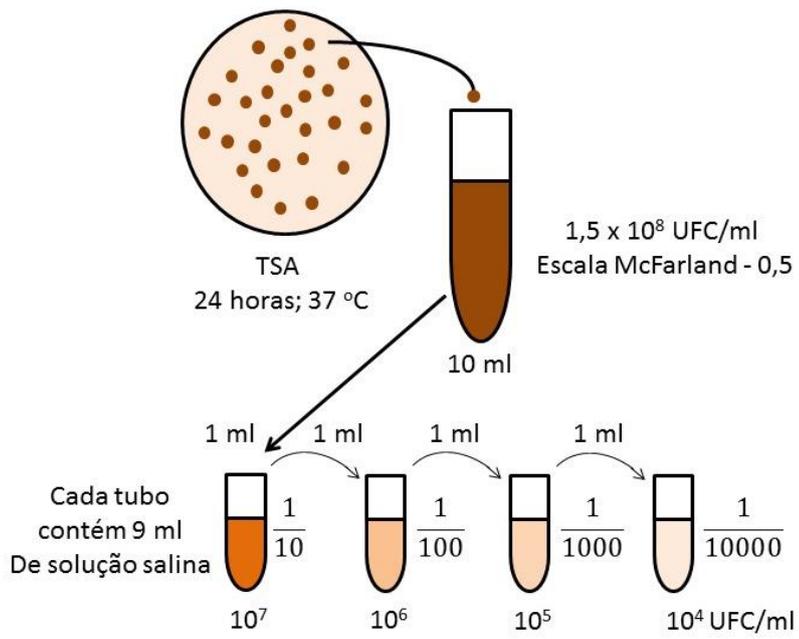


Figura 4.15: Processo de diluição das concentrações de *E. coli*

Capítulo 5

Modelagem computacional do sensor

Neste capítulo, apresentam-se os procedimentos para a construção de modelagens computacionais, visando a comparação entre resultados experimental e simulado obtidos neste trabalho.

5.1 O BeamPROP™ e a modelagem óptica utilizando o método BPM

O BeamPROP™ é uma ferramenta baseada no Método de Propagação de Feixe (BPM) para projetar simulações de dispositivos e circuitos de guia de ondas integradas e de fibras ópticas. Seus recursos avançados permitem a simulação com eficiência de dispositivos complexos.

O BeamPROP™ tem aplicações em uma ampla gama de dispositivos integrados e de fibra óptica, incluindo, dispositivos WDM (Multiplexação por divisão de comprimento de onda; do inglês *Wavelength-division Multiplex*) tais como roteadores de rede de guias (AWG - *Arrayed waveguide gratings*) em matrizes; interruptores, como acoplador direcional; moduladores, como os do tipo Mach-Zehnder; dispositivos de interferência multimodo; *design* de fibra padrão e especial; estruturas dos sensores dentre outros.

O *software* tem capacidades de simulação 2D e 3D, com malha não uniforme para materiais anisotrópicos e não lineares. É capaz de implementar formulação de BPM bidirecional para considerar a reflexão ao longo da direção de propagação. Possui ferramentas de medição abrangentes para calcular campos, distribuição de energia, perda, etc.

O método de propagação do feixe é uma maneira numérica de determinar os campos dentro de um guia de ondas. Com este método, o perfil de modo de um guia de onda incomum, como um acoplamento em y, pode ser determinado com facilidade. O perfil do modo dinâmico pode ser estimado enquanto a onda se propaga através do guia de onda estudado.

O BPM se decompõe em uma superposição de ondas planas, cada uma viajando em uma direção diferente. Estas ondas planas individuais são propagadas por uma distância finita, predeterminada pelo guia de onda até o ponto em que o campo precisa

ser determinado. Posteriormente, todas as ondas planas individuais são adicionadas numericamente para retornar ao modo espacial.

O princípio da superposição é a base da teoria do BPM. Ele determina que, para um sistema linear, uma combinação linear de soluções para o sistema é também uma solução para o mesmo sistema linear. Este princípio se aplica a sistemas lineares de equações algébricas, equações diferenciais lineares ou sistemas de equações diferenciais lineares. Considerando-se como exemplo um guia retangular (Figura 5.1), qualquer campo guiado dentro desta guia de onda deve necessariamente satisfazer a equação de onda

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial t^2} = v^2 \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2}. \quad (5.1)$$

Se o meio é isotrópico e homogêneo, as ondas planas são soluções naturais da equação de onda.

$$\psi = \psi_0 \cos(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r} + \delta) \quad (5.2)$$

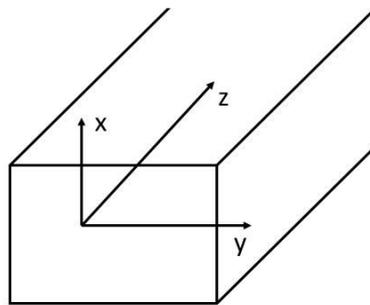


Figura 5.1: Guia de onda retangular.

Como a equação de onda é linear, qualquer superposição linear de soluções também constituirá uma solução válida. Este importante fato constitui a base da teoria da propagação do feixe. Para descrever o modo geral deste guia de ondas, basta utilizar uma superposição de ondas planas, cada uma com frequência angular idêntica, mas com vetor de propagação diferente. A essência da teoria é que as ondas planas formam um conjunto de bases para a descrição do modo [61].

5.2 A construção dos Modelos no *BeamPROP*TM

A modelagem computacional e as simulações efetuadas com os modelos implementados foram realizadas em parceria com o Laboratório de Eletromagnetismo Computacional (LEC) do Instituto de Estudos Avançados (IEAv). Os parâmetros iniciais foram definidos no *BeamPROP*TM a partir das características da estrutura da fibra óptica utilizada e das dimensões da curva implementada. Posteriormente variações tanto das dimensões da fibra, quanto das características da curva foram alteradas para valores comerciais, visando otimizar o sensor para um modelo ótimo, tanto para as dimensões da fibra quanto para as dimensões da curva.

A Figura 5.2 mostra a interface de modelagem do *BeamPROP*TM, onde o modelo pode ser desenhado em 2D ou 3D. No modelo desenvolvido em 2D, observa-se em amarelo as dimensões da POF e em vermelho o meio externo. Em destaque, uma faixa contínua azul representa a presença de bactérias presas ao imunossensor POF.

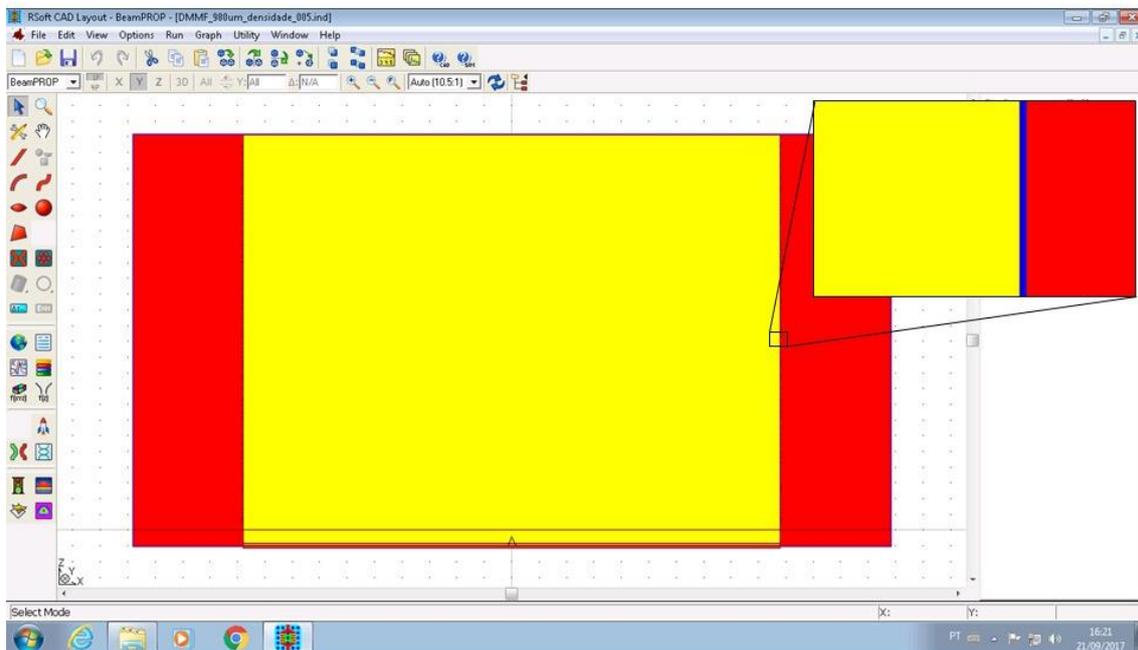


Figura 5.2: Interface de programação do *BeamPROP*TM. Em destaque a representação das bactérias como faixa contínua (azul).

Utiliza-se um mapeamento espacial para representar a fibra curvada num modelo geométrico espacial de fibra reta. Para isso, os índices de refração passam a ter variação radial, de modo que diminuem de valor para a região pressionada e aumentam de valor para a região distendida, dando assim uma modelagem para os diferentes caminhos

ópticos no guia curvo. Isso pode ser visto na Equação (5.3), onde R é o raio de curvatura da fibra e z é a posição na direção da curva, para curvas lentas ($z \ll R$). O índice de refração de uma fibra curvada (n') sofre uma distorção em relação a parte não curvada [62].

$$n' = n_{material} \cdot e^{\left(\frac{z}{R}\right)} \approx n_{material} \cdot \left(1 + \frac{z}{R}\right) \quad (5.3)$$

A Figura 5.3 mostra a tela de operação do BeamPROP™ durante a simulação de uma POF de 1000 μm curvada com um raio de 5,0 mm. À esquerda, tem-se o andamento da propagação das ondas na fibra, onde a região amarela representa a POF e a vermelha o meio externo. É possível visualizar a simulação sendo realizada na fibra de baixo para cima. Neste caso, ela foi interrompida próximo de 13.000 μm na direção de propagação. Observa-se que a parte mais clara no início da simulação, representa a luz sendo inicialmente guiada ainda com a fibra reta. Este padrão praticamente branco de distribuição da energia é característico da entrada definida como multimodo, o que representa bem o sensor implementado experimentalmente. A curva na fibra foi implementada da direita para à esquerda. Assim, observa-se que ao longo da propagação, há uma concentração maior da energia do lado direito da fibra simulada, representando que esta energia se concentra na parte externa da curva da fibra.

No monitor à direita, observa-se a atenuação de potência correspondente ao longo da propagação na fibra.

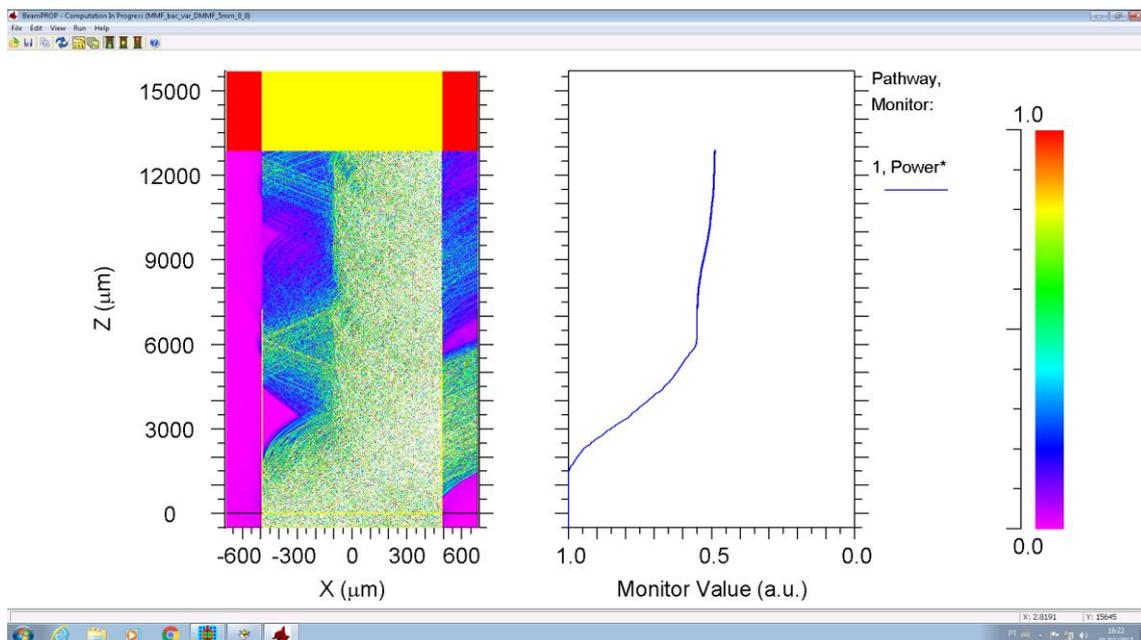


Figura 5.3: Interface do BeamPROP™ em funcionamento.

A camada adicionada à parte exterior da fibra para modelar uma cobertura de bactérias possui dimensões variáveis na espessura. A variação da espessura desta camada visa simular o que ocorre gradativamente com a captura de bactérias pelo imunossensor. Simultaneamente, o índice de refração desta camada também pode ser avaliado dentro dos limites já determinados de 1,33 e 1,39, ou seja, água pura e bactéria pura, respectivamente. Desta forma, foi possível estimar o comportamento da potência de saída da fibra em função do índice de refração e espessura da camada de bactérias.

Essa camada foi simulada em regiões diferentes da fibra para investigar se um possível acúmulo de bactérias em áreas distintas influenciam no funcionamento do imunossensor. A Figura 5.4 (a) ilustra o modelo implementado no *BeamPROP*TM com a camada cobrindo toda a curva e outras regiões menores com: apenas a metade da curva mais próxima da entrada da luz (Figura 5.4 (b)); com apenas a metade mais próxima da saída da luz (Figura 5.4 (c)) e com apenas o centro da curva da fibra coberto (Figura 5.4 (d)).

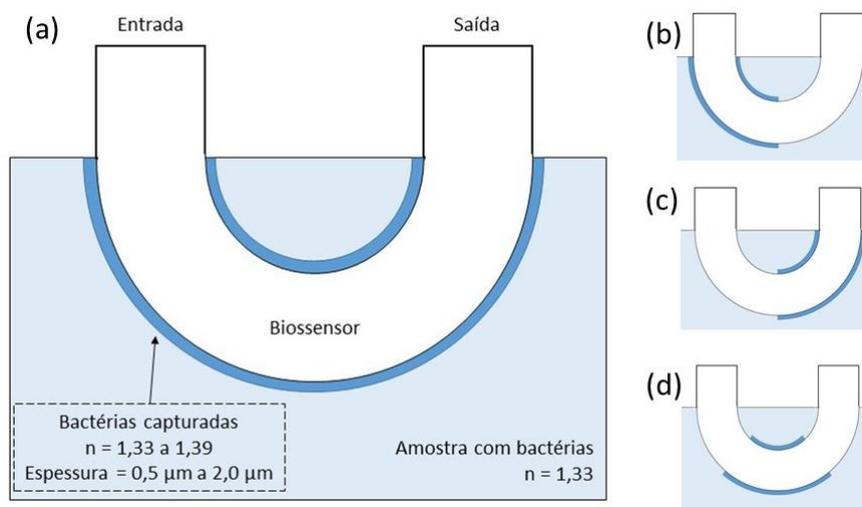


Figura 5.4: Ilustração do modelo implementado no *BeamPROP*TM representando a presença de bactérias (a) cobrindo toda a curva do sensor. (b) apenas a metade da curva mais próxima à entrada da luz. (c) apenas a metade mais próxima à saída da luz. (d) apenas o centro da curva da fibra.

Uma segunda estratégia de modelagem do imunossensor foi desenvolvida, substituindo-se a faixa contínua com índice de refração variável por retângulos com 1,0 μm de largura e 2,0 μm de comprimento, que modelam a presença da *E. coli*. Esses retângulos foram adicionados aleatoriamente em contato com a POF, sendo acrescentados sequencialmente. O índice de refração considerado para as bactérias foi fixado em 1,39. A Figura 5.5 mostra as bactérias simuladas no destaque em azul.

A fração de cobertura do sensor pelas bactérias foi definida como a densidade linear de bactérias. Esta densidade de bactérias é a razão entre o comprimento de uma bactéria (L_b) multiplicado pelo número de bactérias capturadas pelo sensor (b) e dividido pelo comprimento do sensor (L_s). Por exemplo, para um imunossensor fabricado com a POF de 980 μm e raio de curvatura de 4,0 mm ter 30 % de sua área coberta por um determinado número de bactérias (b), ou seja, uma densidade linear de bactérias igual a 0,30, têm-se:

$$\text{Densidade linear de bactérias} = \frac{b \cdot L_b}{L_s} = 0,30 \quad (5.4)$$

$$b = 0,30 \frac{L_s}{L_b} = 0,30 \frac{\pi \cdot 4.000 \mu\text{m}}{2,0 \mu\text{m}} \cong 1884 \text{ bactérias}. \quad (5.5)$$

Assim, foram necessários neste caso 1884 retângulos distribuídos aleatoriamente sobre a superfície da POF. Um sensor completamente coberto, ou seja, com densidade linear de bactérias igual a 1,0 (100 %), possui 0,5 bactérias/ μm .

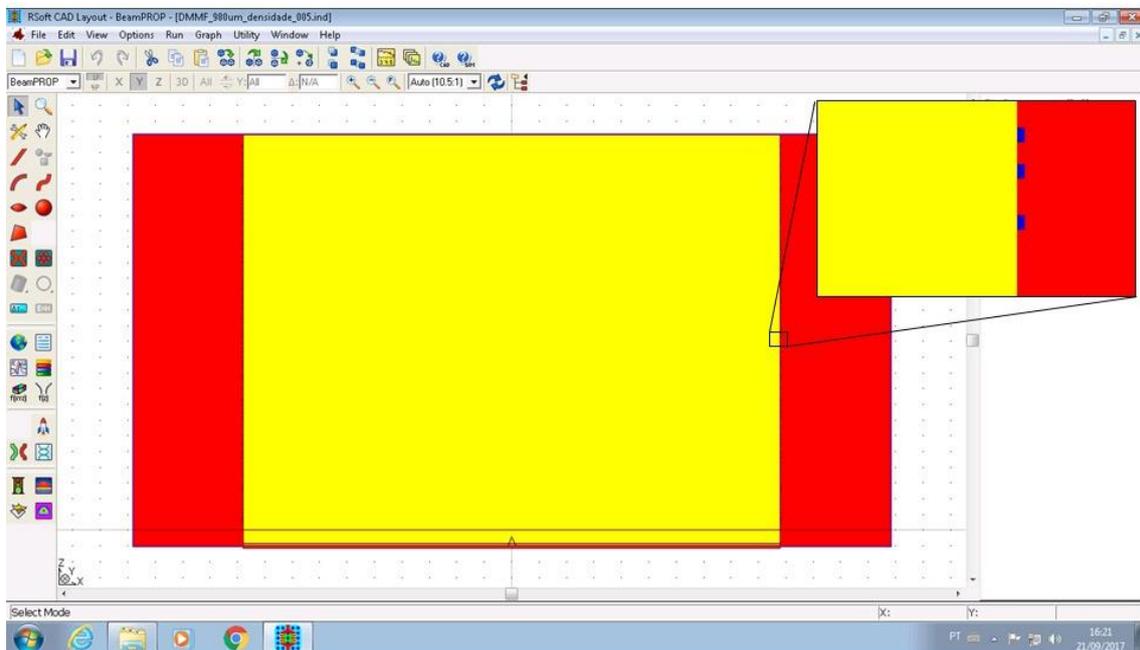


Figura 5.5: Interface de programação do BeamPROP™. Em destaque a representação das bactérias como medidas de 1,0 x 2,0 μm (azul) e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente.

5.3 Resultados e discussão da simulação da medida do índice de refração

No processo de calibração, o sensor foi imerso em soluções de sacarose com índices de refração variáveis entre 1,33 e 1,39. Assim, de acordo com as etapas descritas anteriormente, foram realizadas simulações visando identificar as características da potência de saída da fibra óptica curvada com diferentes raios. Os sensores fabricados com POF de 980 μm (após a remoção da casca) e raio de curvatura de 4,0 mm já apresentaram bons resultados experimentais [11]. Entretanto, visando o aumento da sensibilidade do sensor e, considerando-se as limitações físicas da fibra óptica, seu material e possibilidade de curvaturas, foram investigados raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm para esta POF.

A Figura 5.6 mostra o resultado da simulação. Observa-se que o sensor mais curvado não é necessariamente o mais sensível, ou seja, não há uma relação direta entre o raio de curvatura e a sensibilidade. O raio de 5,0 mm apresenta a menor potência de saída, sendo de aproximadamente 50 % da potência de entrada para o índice de refração da água pura ($n = 1,33$).

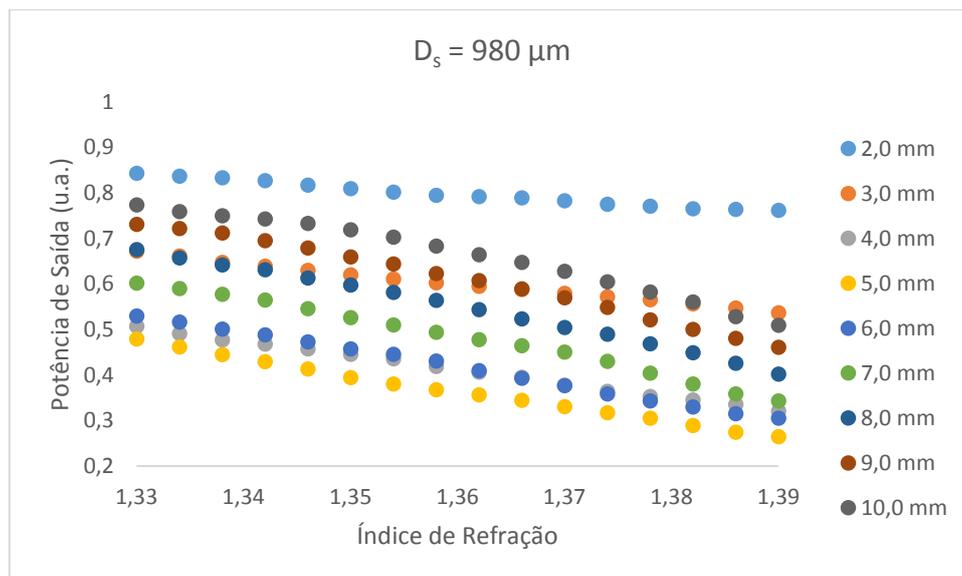


Figura 5.6: Resultado da simulação da fibra óptica de 980 μm de diâmetro. A potência de saída varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm.

Para a apresentação da sensibilidade de acordo com os experimentos realizados neste trabalho, os valores apresentados na Figura 5.6 foram normalizados em relação ao índice de refração da água pura. Os coeficientes angulares das retas de tendência definidas para cada curva determinam a sensibilidade do sensor (dP/dn). Desta forma é possível comparar a variação da potência de saída entre os índices de refração de 1,33 a

1,39 para os respectivos raios de curvatura, determinando o sensor mais sensível. A Figura 5.7 apresenta os resultados normalizados em relação ao índice de refração da água pura para os sensores simulados com a POF de 980 μm . Observa-se que o sensor com raio de curvatura de 5,0 mm (sensibilidade de 7,36), apresentou-se mais sensível do que o sensor com raio de curvatura de 4,0 mm (sensibilidade igual a 6,12) implementado experimentalmente.

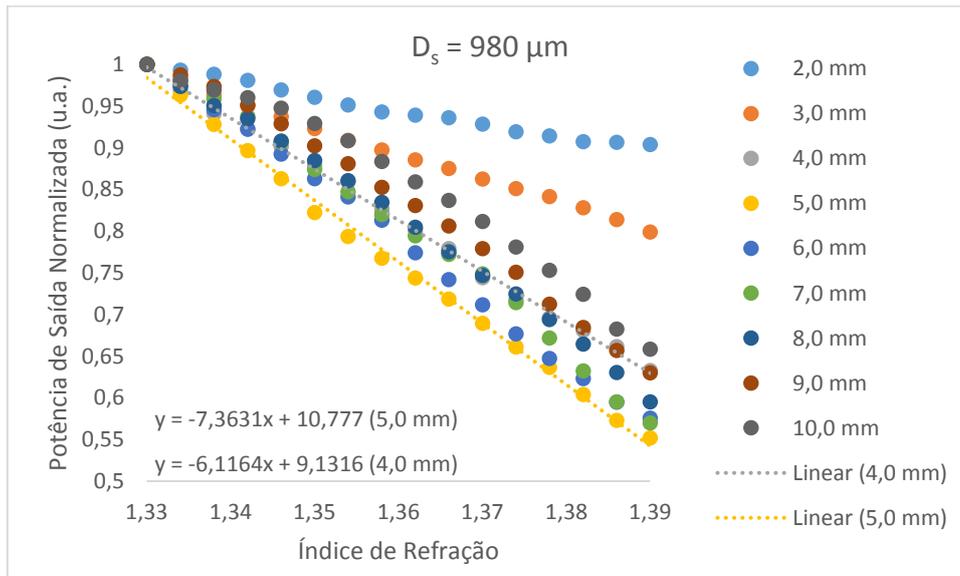


Figura 5.7: Resultado da simulação da fibra óptica de 980 μm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. São apresentadas as equações das sensibilidades para os raios de 4,0 mm e 5,0 mm.

Visando-se ainda aumentar a sensibilidade do sensor, foram investigados o comportamento de sensores fabricados com outras fibras comerciais com diâmetros de 750 μm , 500 μm e 250 μm . Os resultados apresentados a seguir foram todos normalizados em relação ao índice de refração da água pura, facilitando a observação das sensibilidades. Da Figura 5.8 a Figura 5.10 são apresentados os gráficos normalizados com a equação da reta de maior sensibilidade para cada diâmetro de fibra simulado, sendo de 750 μm , 500 μm e 250 μm respectivamente.

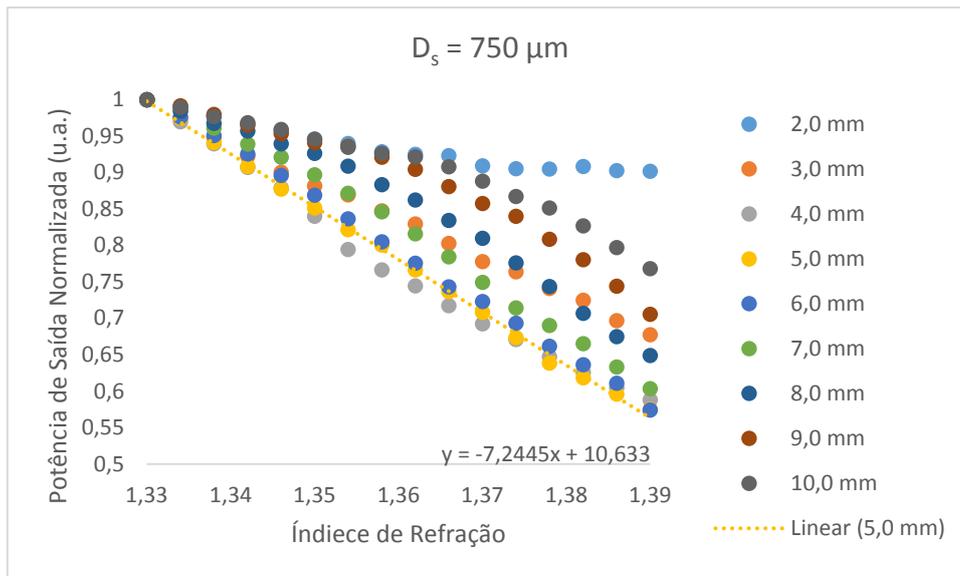


Figura 5.8: Resultado da simulação da fibra óptica de 750 μm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. A equação da reta de maior sensibilidade é apresentada.

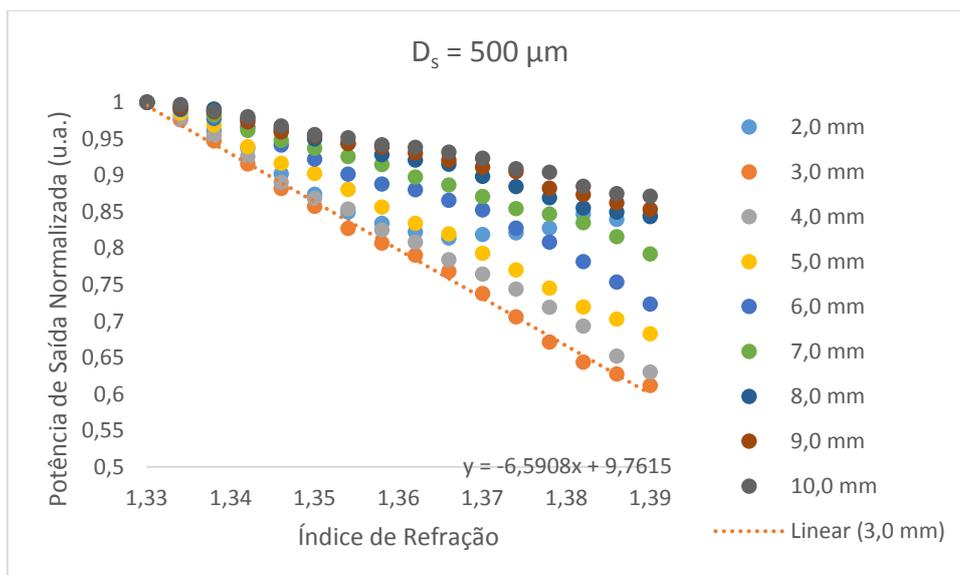


Figura 5.9: Resultado da simulação da fibra óptica de 500 μm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 2,0 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. A equação da reta de maior sensibilidade é apresentada.

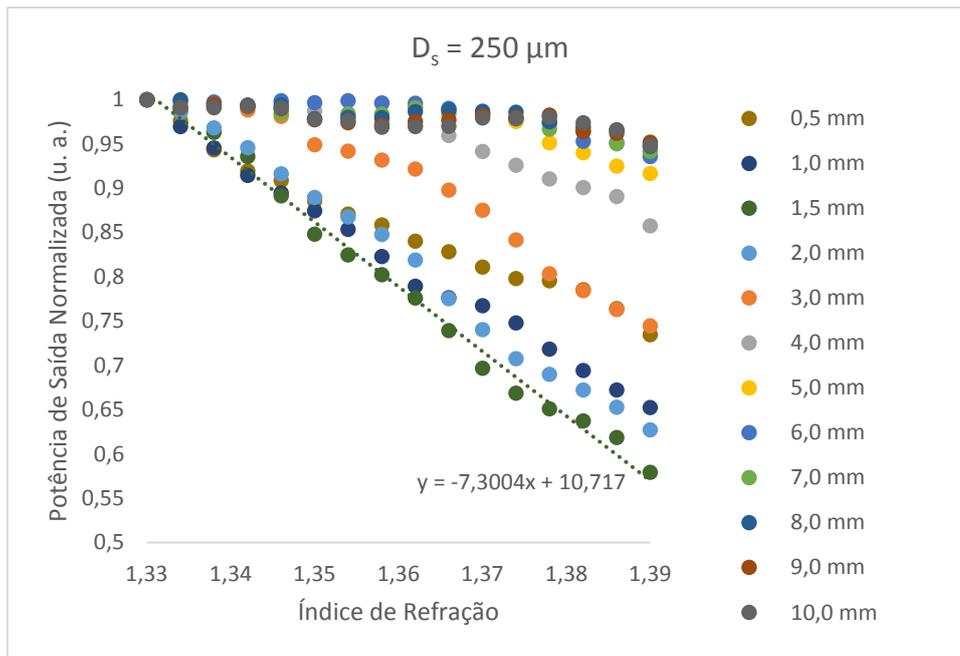


Figura 5.10: Resultado da simulação da fibra óptica de 250 μm de diâmetro. A potência de saída normalizada varia em função do índice de refração para fibras em forma de U com raios de curvatura entre 0,5 mm e 10,0 mm, permitindo a avaliação da sensibilidade pelo coeficiente angular da reta de tendência definida para cada curva. A equação da reta de maior sensibilidade é apresentada.

A Tabela 5.1 apresenta os respectivos coeficientes de sensibilidades encontrados para cada fibra. Em destaque, observam-se os sensores mais sensíveis. O sensor mais sensível foi feito com fibra de 980 μm e raio de curvatura igual a 5,0 mm (sensibilidade de 7,36), seguido, respectivamente, dos sensores com fibra de 250 μm e raio de curvatura de 1,5 mm (sensibilidade de 7,30), fibra de 750 μm e raio de curvatura de 5,0 mm (sensibilidade de 7,24) e fibra de 500 μm e raio de curvatura de 3,0 mm (sensibilidade de 6,59).

Tabela 5.1: Sensibilidades (dP/dn)

Raio da curva (mm)	Diâmetro da fibra (μm)			
	250	500	750	980
	Sensibilidade (dP/dn)			
0,5	4,00	-	-	-
1,0	5,67	-	-	-
1,5	7,30	-	-	-
2,0	6,61	2,72	1,67	1,70
3,0	4,53	6,59	5,24	3,21
4,0	2,37	5,99	7,04	6,12
5,0	1,44	5,41	7,24	7,36
6,0	0,93	4,44	7,14	7,33
7,0	0,75	3,38	6,80	7,23
8,0	0,64	2,78	5,90	6,66
9,0	0,57	2,45	4,64	6,35
10,0	0,55	2,19	3,57	5,72

5.4 Resultados e discussão da simulação do imunossensor

5.4.1 Simulação das bactérias pela variação do índice de refração e espessura da camada

Na modelagem do imunossensor foi inserida uma camada (região azul na Figura 5.11 (a)) tanto internamente, quanto externamente à POF para simular a presença das bactérias. Esta camada de bactérias é representada com espessura de 100 μm apenas para facilitar a visualização, enquanto a região vermelha representa a solução aquosa ao redor da fibra sensora.

A Figura 5.11 (b) mostra a propagação do sinal óptico ao longo da fibra curvada recoberta com uma camada de bactérias *E. coli* com 2,0 μm de espessura e índice de refração $n = 1,39$. É possível observar a formação de um padrão de interferência causado por parte da luz que é refletida na interface bactéria-água. Esta simulação foi realizada com um padrão de entrada gaussiano para facilitar a visualização deste padrão de interferência.

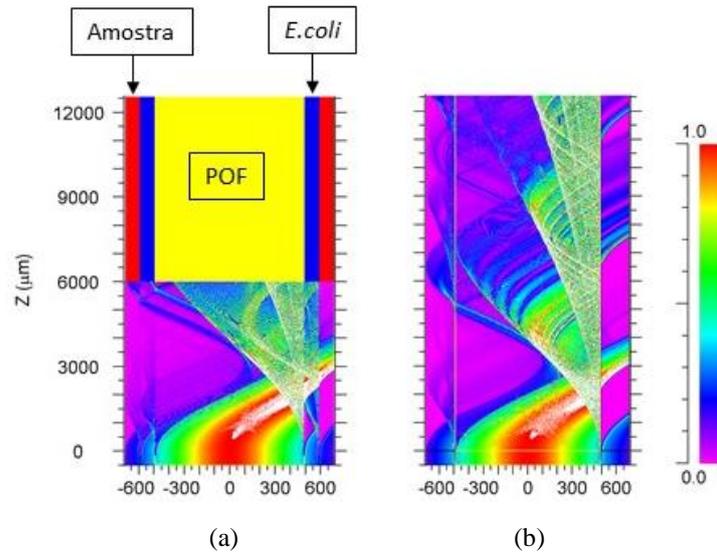


Figura 5.11: Modelo implementado no BeamPROP™: (a) simulação interrompida, mostrando regiões da POF de 980 μm com raio de curvatura de 4,0 mm (amarelo), região com *E. coli* com 100 μm de espessura para facilitar a visualização (azul) e região com amostra de *E. coli* em água (vermelho); (b) simulação de *E. coli* com 2,0 μm de espessura e índice de refração de $n = 1,39$, onde aparece um padrão de interferência.

Para a compreensão da existência de um padrão de interferência, pode-se avaliar inicialmente a trajetória de apenas um raio luminoso emitido pelo LED na entrada da POF (Figura 5.12). Considera-se que ao atingir a interface POF/água, este raio refrata, afastando-se da normal (N_0) e formando com esta o ângulo de incidência (θ_0). Com a captura das bactérias pelo anticorpo, uma camada de bactérias (C_1) é formada e o raio luminoso encontra uma nova interface bactéria/água ($n_b/n_{\text{água}}$) formando com esta um ângulo de incidência (θ_1), relacionado à nova normal (N_1). Se a espessura da camada de bactéria aumenta (C_2) (Figura 5.12), o raio luminoso encontrará a interface bactéria/água com um novo ângulo de incidência (θ_2). Esse ângulo é menor do que o anterior ($\theta_2 < \theta_1$). Se θ_1 for o ângulo crítico (θ_c) para a relação entre n_b e $n_{\text{água}}$, então o raio refletirá para a camada de bactérias (C_1), retornando para a POF.

Com o aumento da espessura de bactérias (C_2) o ângulo de incidência (θ_2) será menor do que o ângulo crítico (θ_c), não ocorrendo a reflexão total, mas sim a refração para a água. Logo, quanto mais distante da curva estiver a interface bactéria/água mais luz refrata, sendo perdida para o meio externo.

Entretanto, com a captura de mais bactérias o índice de refração médio das camadas bacterianas C_1 e C_2 aumenta. Desta forma θ_c diminui, pois

$$\theta_c = \arcsen \frac{n_{\text{água}}}{n_b} \quad (5.6)$$

Assim, mesmo para uma camada fixa, um raio que antes seria refratado, pode agora vir a ser refletido, caso seu ângulo de incidência (θ_1 ou θ_2) passe a ser maior do que o novo ângulo crítico (θ_c). Ocorre então uma “competição” entre os dois efeitos na camada de bactérias (aumento da espessura e aumento do índice de refração), podendo gerar uma oscilação na potência de saída da fibra, proveniente dos muitos modos de propagação que estão sofrendo constantes interferências.

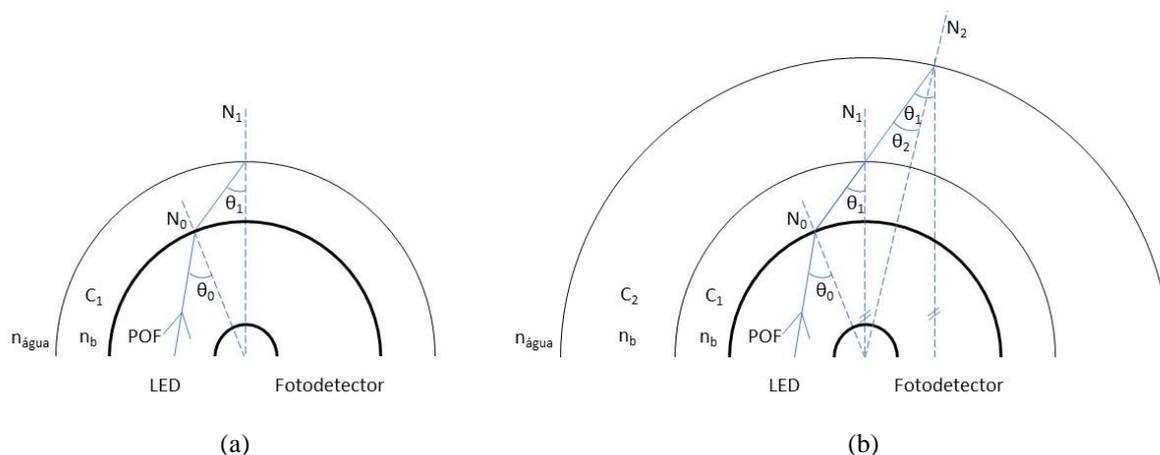


Figura 5.12: Raio luminoso propagado na POF curvada: (a) primeira situação, quando o raio encontra a interface POF/bactérias, sendo N_0 , N_1 as retas normais às superfícies da POF e C_2 , respectivamente, n_b é o índice de refração médio na camada de bactérias C_1 , $n_{\text{água}}$ o índice de refração da água, e θ_0 e θ_1 os ângulos de incidência na superfície da POF e da camada C_1 , respectivamente. (b) segunda situação, quando o raio encontra a interface bactéria/bactéria com espessura maior, onde θ_2 é o ângulo de incidência na camada C_2 e N_2 é a reta normal a esta superfície.

Foram realizadas inicialmente simulações da POF de 980 μm de diâmetro, com raio de curvatura de 4,0 cm, para comparação com os sensores fabricados. A camada com índice de refração variável foi acrescentada em torno da fibra para simular a presença da bactéria em regiões diferentes: em toda a curva (Figura 5.13), no início da curva (Figura 5.14), no final da curva (Figura 5.15) e no centro da curva (Figura 5.16). Desta forma pode-se observar se houve diferença significativa na variação da potência óptica de saída nestes casos. Os gráficos são apresentados após o processo de normalização, que permite a comparação das espessuras implementadas entre 0,5 μm e 2,0 μm .

A normalização é realizada dividindo-se cada valor encontrado de potência real na saída pelo valor da potência real na referência de água pura ($n = 1,33$). Por isso é possível que alguns valores de potências de saída normalizados encontrados sejam

maiores do que o valor da potência de saída normalizada da referência. Lembrando, porém, que a potência real na saída do sensor sempre é menor do que o valor real da potência na entrada do sensor, pois na curva sempre há perda de potência óptica.

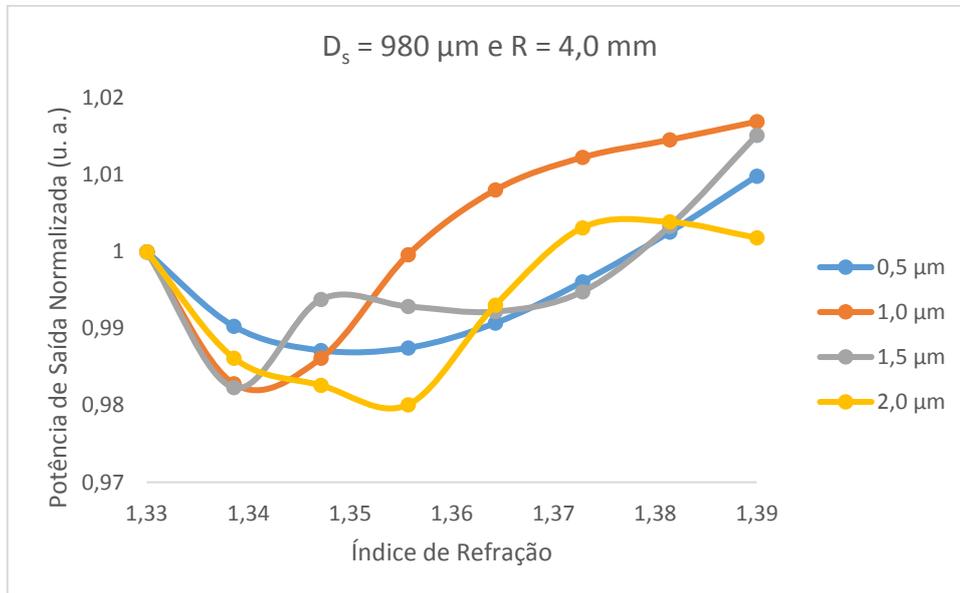


Figura 5.13: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável em toda a fibra.

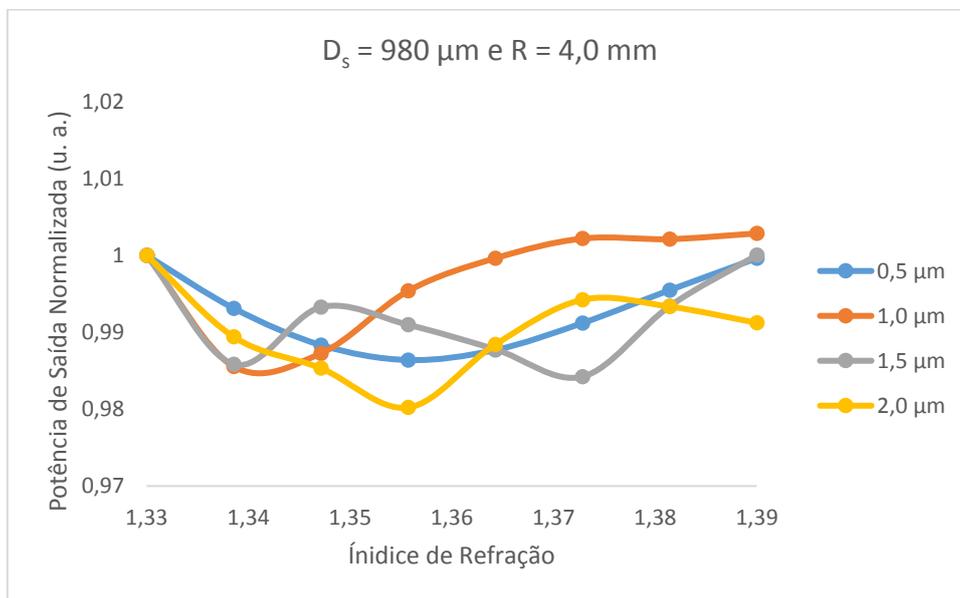


Figura 5.14: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na metade inicial da curva fibra.

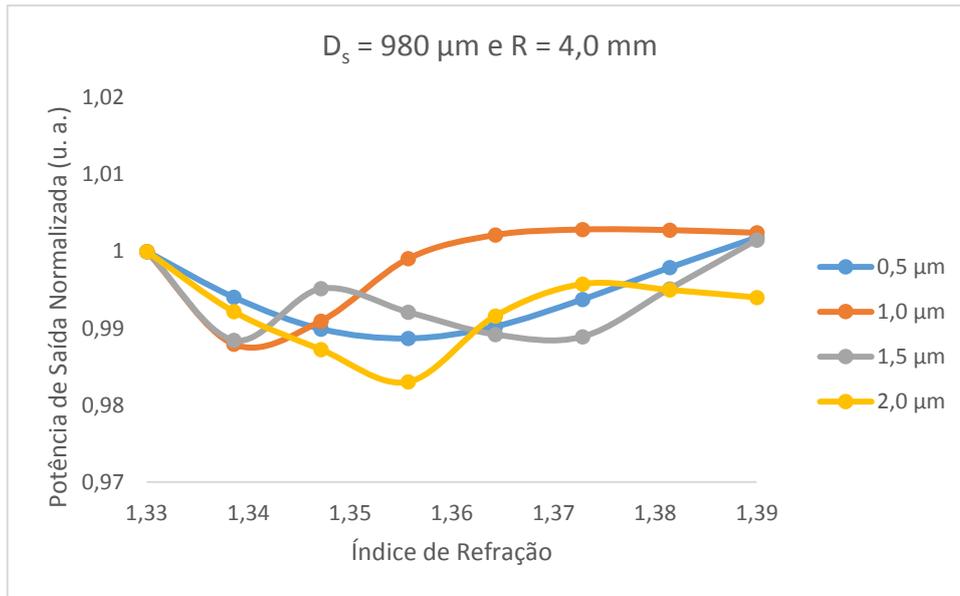


Figura 5.15: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na metade final da curva da fibra.

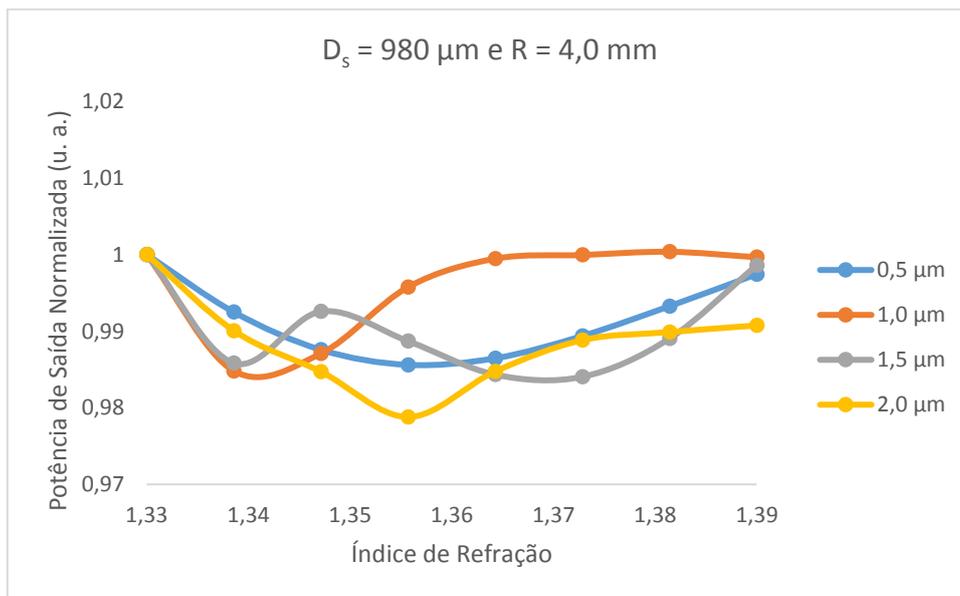


Figura 5.16: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na metade central da curva da fibra.

Observa-se uma atenuação de aproximadamente 2,0 % da potência óptica de saída normalizada para uma camada de bactérias de 2,0 μm de espessura com índice de refração próximo de 1,35. Não há uma diferença significativa na atenuação da potência óptica para os casos simulados em que apenas uma parte da fibra é coberta com bactérias.

Considerando-se que a fibra de 250 μm possui uma alta sensibilidade para a curva com raio de 1,5 mm, foi realizada uma simulação da presença da bactéria nesta fibra, com a variação do índice de refração de uma camada ao longo de toda a curva, com espessura entre 0,5 μm e 2,0 μm . A Figura 5.17 mostra o resultado desta simulação. Observa-se que atenuação da potência de saída é maior do que nos casos anteriores, caindo até aproximadamente 5 % da potência de saída normalizada.

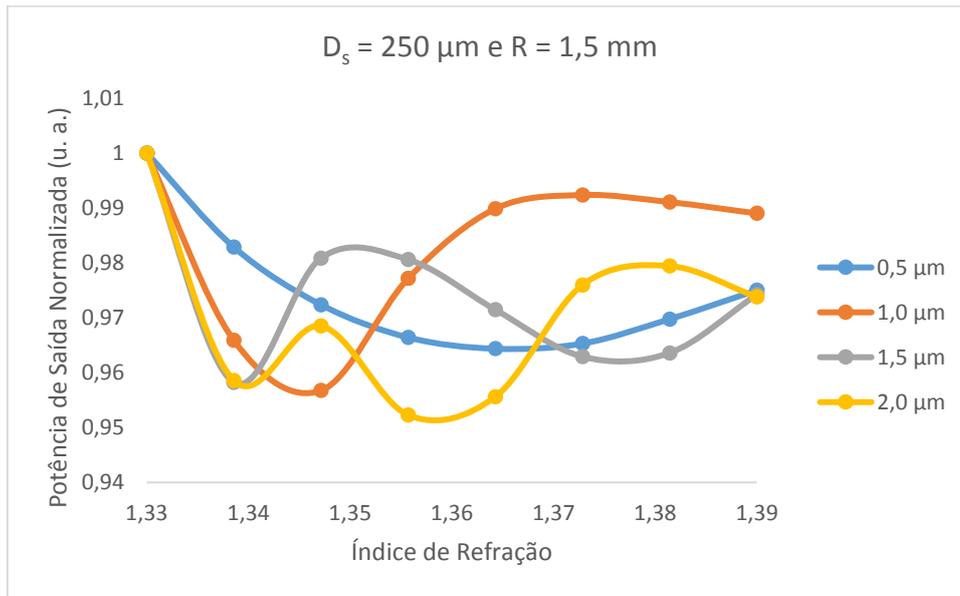


Figura 5.17: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável em toda a curva da fibra de 250 μm de espessura com raio da curva de 1,5 mm.

As oscilações apresentadas provenientes do padrão de interferência descrito são complexas para a análise dos dados, pois, no caso de um sensor real implementado, elas indicariam potências de saída iguais para índices de refração diferentes. Numa análise comparativa, apenas a primeira atenuação da potência óptica normalizada deve ser considerada. Assim, esta modelagem não deve ser utilizada para fins comparativos. Estes resultados foram apresentados apenas para evidenciar um método aparentemente intuitivo, mas que não apresentou resultados satisfatórios.

5.4.2 Simulação das bactérias pela variação da densidade linear

Conforme descrito na construção do modelo computacional (Seção 5.2), uma segunda estratégia de modelagem do imunossensor foi desenvolvida. Retângulos com índice de refração de 1,39 e dimensões que modelam uma *E. coli* (1,0 μm de largura e

2,0 μm de comprimento) foram inseridos nas laterais da POF. Essas bactérias foram adicionadas em posições aleatórias de forma a produzir densidades equivalentes a 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % e 30 %. Estes valores foram definidos a partir de imagens das bactérias sobre o sensor real, produzidas em análise microscópica. A adição controlada das bactérias, alterando a densidade linear visou simular a captura das bactérias pelo anticorpo, que vai acontecendo aleatoriamente ao longo do tempo no experimento.

A Figura 5.18 apresenta os resultados para a simulação de um imunossensor fabricado com POF de 980 μm de diâmetro após descascada e raio de curvatura de 4,0 mm. Este foi o sensor implementado experimentalmente. Observa-se uma tendência de estabilização da potência de saída para densidades acima de 25 %, limitando a atenuação da potência na saída normalizada em aproximadamente 10 %.

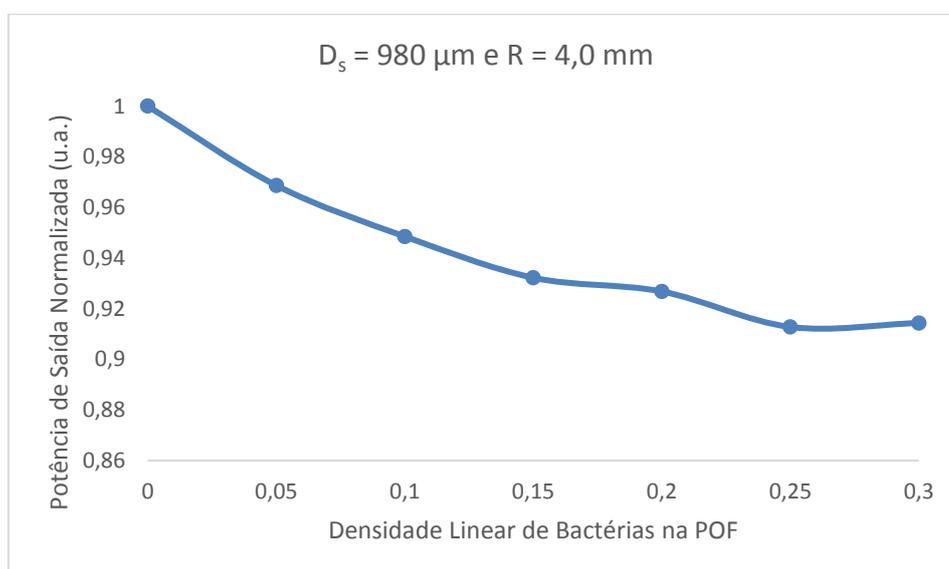


Figura 5.18: Potência de saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de 1,0 x 2,0 μm e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U com POF de 980 μm com raio de curvatura de 4,0 mm.

Esta segunda estratégia de modelagem aproxima-se mais da situação real, considerando-se que o índice de refração utilizado nas bactérias simuladas foi 1,39 e não um índice variável como na simulação anterior. Outra questão importante é que, o fato de não se ter uma faixa contínua na lateral da POF evitou o aparecimento de um padrão de interferência. Assim, as oscilações que apareceram no primeiro modelo não estão presentes nesta nova estratégia de modelagem.

Considerando-se ainda a possibilidade de miniaturização do imunossensor, foram realizadas simulações também para o sensor com POF de 250 μm de diâmetro e raio de curvatura de 1,5 mm. A Figura 5.19 apresenta os resultados encontrados, onde a

atenuação da potência normalizada chega a 13 %, quando começa a estabilizar para uma densidade linear de 30 %.

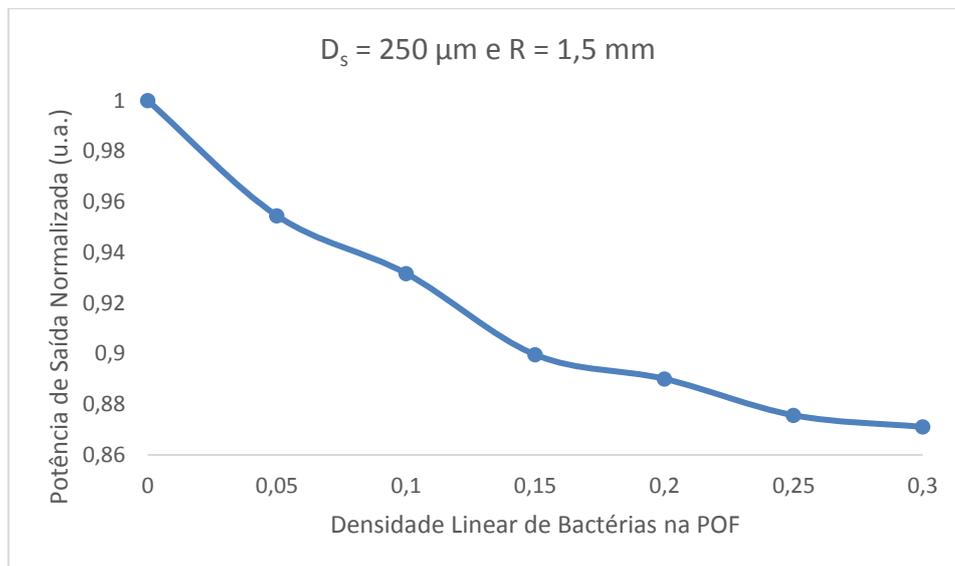


Figura 5.19: Potência de saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de 1,0 x 2,0 μm e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U com POF de 250 μm com raio de curvatura de 1,5 mm.

A tendência de estabilização da potência de saída parece definir um limite para o sensor, mesmo que ele continuasse a capturar bactérias, aumentando a densidade linear. Isto pode dificultar a detecção de baixas concentrações de bactérias, pois afeta diretamente a curva de sensibilidade.

Capítulo 6

Resultados e discussão da medida de índice de refração

6.1 Comparação entre os sistemas com a plataforma Arduino e o Amplificador Lock-in

Inicialmente foram produzidas soluções de sacarose com os mesmos valores do experimento usando o Amplificador Lock-in para aquisição de dados. As concentrações de sacarose fabricadas com 15 %, 25 %, 30 %, 45 % e 52 % produzem índices de refração de 1,35, 1,36, 1,37, 1,38 e 1,39, respectivamente. Estas soluções são utilizadas e descartadas após cada experimento. A metodologia para a realização dos experimentos foi a mesma empregada nos experimentos com o Amplificador Lock-in e descritas anteriormente.

A Tabela 6.1 apresenta os resultados do sensor em forma de U utilizando o sistema implementado com a plataforma Arduino para apenas um sensor.

Tabela 6.1: Tensões de saída medidas pelo sistema com a plataforma Arduino.

Ensaio #	Índice de Refração de Referência					
	1,334	1,3552	1,3676	1,3733	1,388	1,3937
Tensão de Saída (V)						
Ensaio 1	4,29194	3,49355	3,11129	2,90806	2,41935	2,15806
Ensaio 2	4,35000	3,54194	3,11613	2,92742	2,42419	2,16290
Ensaio 3	4,33548	3,51774	3,11129	2,91774	2,41935	2,16774
Ensaio 4	4,32581	3,51774	3,10645	2,91774	2,42419	2,16774
Ensaio 5	4,33548	3,52258	3,11129	2,91774	2,42219	2,16774
Ensaio 6	4,31129	3,51774	3,10645	2,92258	2,42419	2,16774
Ensaio 7	4,33064	3,52742	3,10645	2,90806	2,41452	2,16290
Ensaio 8	4,31129	3,51290	3,09677	2,90806	2,41935	2,17258
Ensaio 9	4,30645	3,50806	3,09677	2,90323	2,41452	2,16774
Ensaio 10	4,30161	3,50806	3,10645	2,92258	2,43710	2,21613

Todos os ensaios subsequentes para medição de índices de refração foram realizados com os mesmos métodos, assim, serão apresentados apenas os gráficos. A Figura 6.1 apresenta graficamente o resultado do sensor em forma de U. Observa-se que a função quadrática representa bem a tendência de curva determinada pelos pontos experimentais, apresentando um coeficiente de determinação $R^2 = 0,999$.

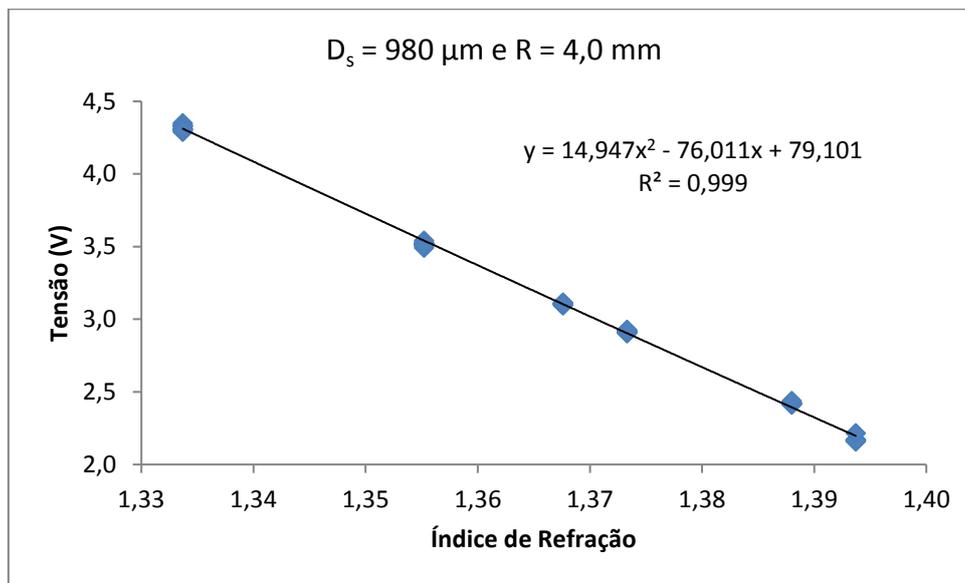


Figura 6.1: Tensão em função do índice de refração no sensor U

Para uma análise comparativa entre os sistemas com Amplificador Lock-in e o sistema com a plataforma Arduino, foi feita a avaliação das sensibilidades dos sensores. Neste caso, a verificação foi feita com os dados normalizados em relação ao índice de refração da água pura e através da primeira derivada da curva linearizada, conforme descrito na metodologia. A Figura 6.2 apresenta a comparação dos resultados normalizados do Sensor U, utilizando a plataforma Arduino e a média dos sensores U, utilizando o amplificador Lock-in que foi estudado na literatura [11]. Observa-se que as sensibilidades dadas pela primeira derivada das curvas de tendência são 8,766 e 8,171 para os sistemas com amplificador Lock-in na plataforma Arduino, respectivamente.

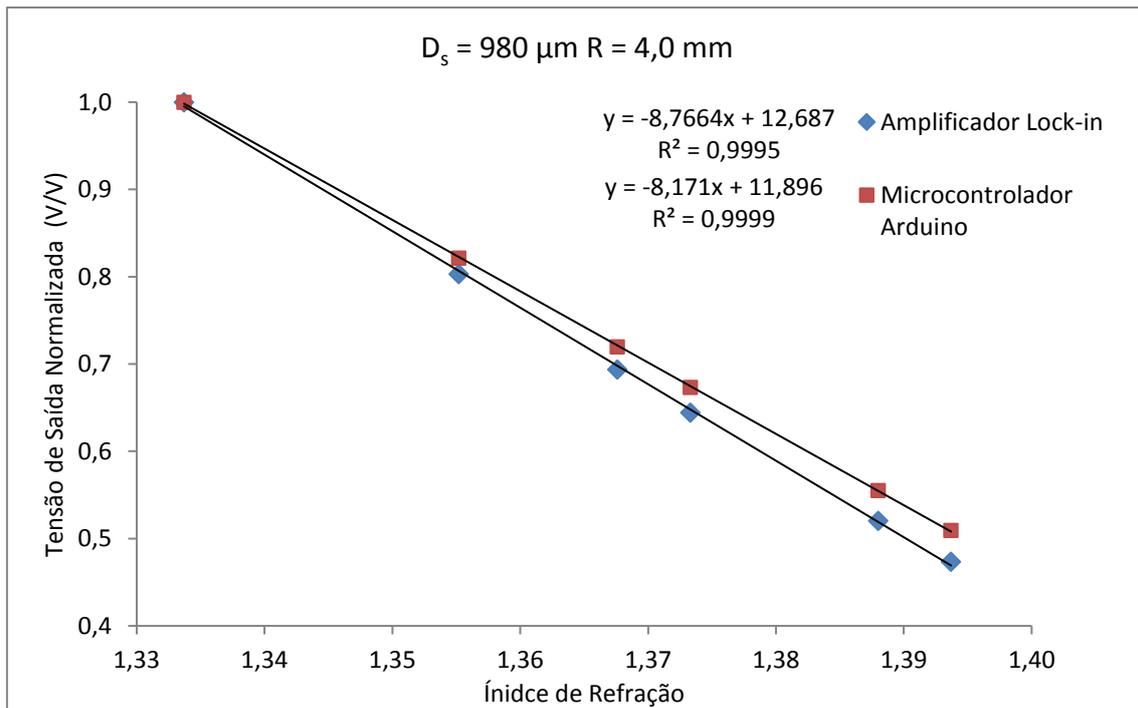


Figura 6.2: Comparação entre o sistema com o Amplificador Lock-in e com a plataforma com o microcontrolador Arduino.

A Tabela 6.2 apresenta as incertezas das medidas calculadas com o GUM, onde n é o índice de refração de referência medido pelo refratômetro, n_L é o índice de refração medido com o Amplificador Lock-in e n_A é o índice de refração medido com a plataforma Arduino.

Tabela 6.2: Índices de refração medidos com o Amplificador Lock-in e com a plataforma Arduino.

n	n_L	n_A
1.334 ± 0.001	1.334 ± 0.001	1.334 ± 0.001
1.3552 ± 0.0004	1.3552 ± 0.0005	1.3552 ± 0.0004
1.3676 ± 0.0003	1.3676 ± 0.0004	1.3676 ± 0.0003
1.3733 ± 0.0003	1.3733 ± 0.0004	1.3733 ± 0.0004
$1,3880 \pm 0.0003$	$1,3880 \pm 0.0004$	1.3880 ± 0.0004
1.3937 ± 0.0004	1.3937 ± 0.0006	1.3937 ± 0.0005

Observa-se que os resultados apresentados pelo sistema com a plataforma Arduino são totalmente compatíveis com o amplificador *Lock-in*. Pela portabilidade do novo sistema e sua eficiência, os experimentos desta tese foram todos realizados com o sistema utilizando a plataforma Arduino. O sistema de medida do índice de refração não necessita de um sensor de referência, como no caso do imunossensor. Como no sistema com referencial os dois sensores trabalham em paralelo, as medidas encontradas para a análise de índices de refração foram as mesmas.

6.2 Avaliação da influência da hidratação do sensor

Durante a realização do protocolo de funcionalização o imunossensor fica imerso em água por aproximadamente uma semana. Assim, tornou-se importante identificar se este período de hidratação alteraria a sensibilidade do sensor. Desta forma, foi repetido o experimento com o mesmo sensor em forma de U após este ser imerso em água.

As Figura 6.3 e Figura 6.4 apresentam respectivamente os resultados da tensão em função do índice de refração no sensor U antes e depois de imerso por uma semana em água. Observa-se que os ajustes feitos com polinômio do segundo grau apresentam o mesmo coeficiente de determinação (R^2). Os valores medidos são reajustados sempre que o sensor é reposicionado no sistema. Assim, devem-se considerar os valores relativos da variação de tensão entre os índices de refração estudados. Neste caso, conforme estudo anterior, a curva de ajuste utilizada foi uma parábola.

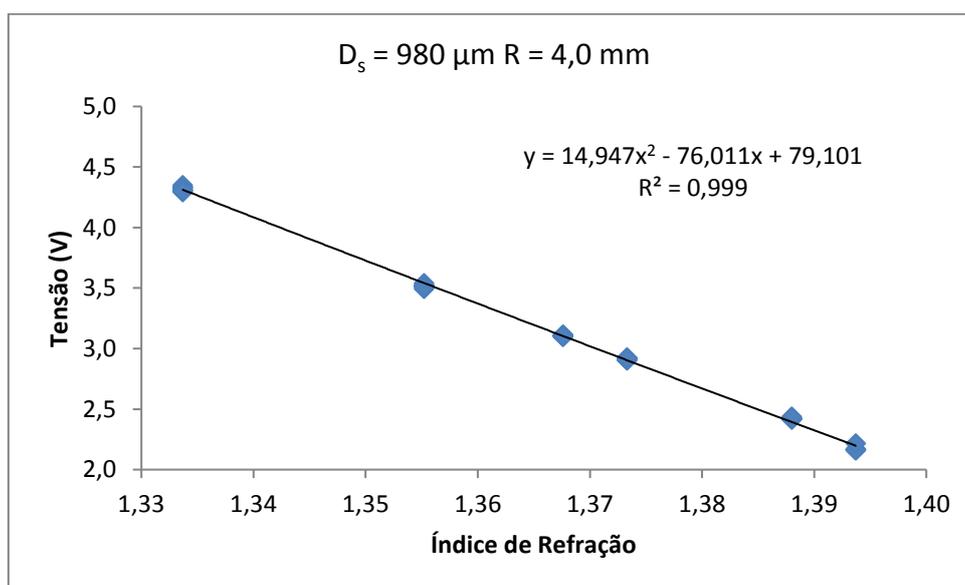


Figura 6.3: Tensão em função do índice de refração no sensor U antes da hidratação.

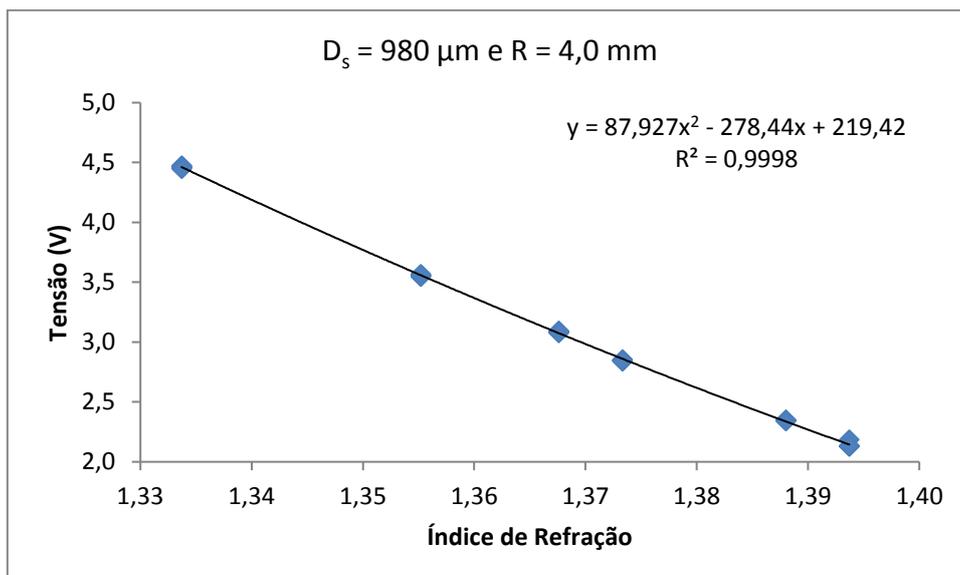


Figura 6.4: Tensões em função do índice de refração no sensor U após uma semana imerso em água.

A Tabela 6.3 apresenta os resultados já convertidos em índice de refração medidos pelo sensor U antes e depois de uma semana imerso em água. Observa-se que não há diferença significativa entre as incertezas das medidas. As sensibilidades são apresentadas nas equações da Figura 6.5, após a normalização dos resultados dos experimentos.

Tabela 6.3: Incerteza das medidas em Índice de Refração do Sensor U

n	n_s	n_s (pós água)
1.334 ± 0.001	1.334 ± 0.001	1.334 ± 0.001
1.3552 ± 0.0004	1.355 ± 0.0004	1.3552 ± 0.0004
1.3676 ± 0.0003	1.368 ± 0.0003	1.3676 ± 0.0003
1.3733 ± 0.0003	1.373 ± 0.0004	1.3733 ± 0.0003
1,3880 ± 0.0003	1.388 ± 0.0004	1.3880 ± 0.0003
1.3937 ± 0.0004	1.394 ± 0.0005	1.3937 ± 0.0004

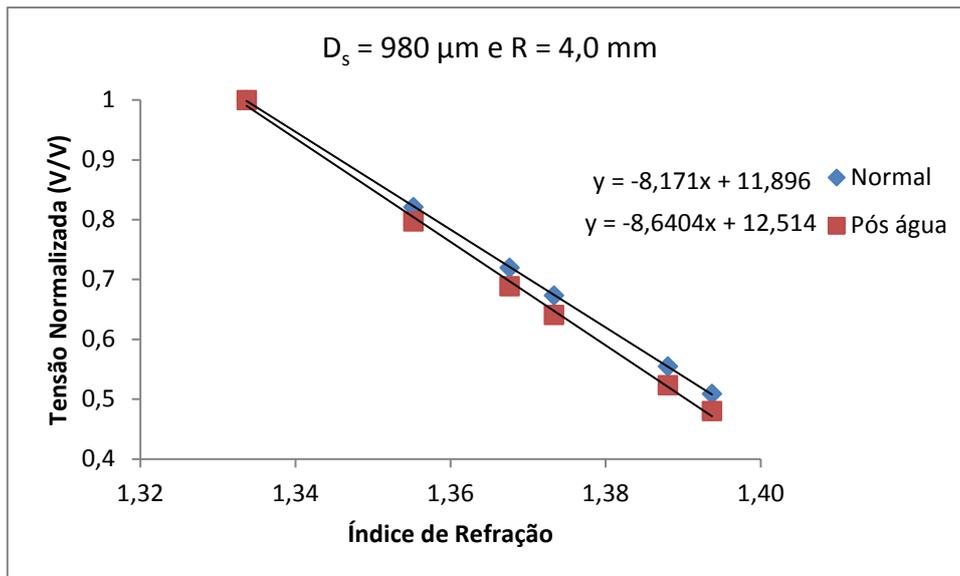


Figura 6.5: Comparação da sensibilidade normalizada do Sensor U antes e depois de hidratado.

Os resultados apresentados pelo sensor em U após uma semana imerso em água são similares aos resultados anteriores, com sensibilidade variando apenas de 8,171 para 8,640. Observou-se assim que o fato do sensor ficar mais tempo imerso em água não altera as características do seu funcionamento.

6.3 Comportamento do sensor em índices de refração próximo ao da água pura

Considerando que a variação do índice de refração nos experimentos com bactérias é muito pequena, ou seja, a suspensão bacteriana investigada possui índices muito próximos ao da água pura, foi realizado um experimento para investigar o comportamento do sensor em forma de U para índices de refração entre 1,33 e 1,35. Desta forma pode-se verificar a sensibilidade e incerteza das medidas do sensor para esta região de índice de refração.

Foram produzidas novas amostras de sacarose, nos mesmos moldes dos experimentos anteriores, sendo que desta vez com concentrações de sacarose a 3 %, 6 %, 9 %, 12 % e 15 %. Foram feitas também 5 amostras de cada concentração para a avaliação dos índices de refração correspondentes e análise da incerteza das medidas. As amostras são descartadas após a realização dos experimentos. A Tabela 6.4 mostra os valores dos índices de refração medidos pelo refratômetro Abbe.

Tabela 6.4: Índices de Refração medidos pelo refratômetro Abbe.

Ensaio #	Concentração de Sacarose (%)				
	3	6	9	12	15
	Índice de Refração				
Ensaio 1	1,3374	1,3413	1,3455	1,3493	1,3526
Ensaio 2	1,3373	1,3414	1,3453	1,3490	1,3528
Ensaio 3	1,3375	1,3417	1,3459	1,3486	1,3529
Ensaio 4	1,3374	1,3408	1,3452	1,3492	1,3525
Ensaio 5	1,3374	1,3417	1,3452	1,3493	1,3530

A Figura 6.6 representa graficamente os resultados obtidos. Os índices de refração médios encontrados para as concentrações produzidas de 3 %, 6 %, 9 %, 12 % e 15 % foram de 1,3374, 1,3414, 1,3454, 1,3491, 1,3528, respectivamente. Considerando-se a curva característica do segundo grau, utilizada na calibração dos experimentos anteriores, pode-se observar que o índice de refração igual a 1,3332 é obtido para a água pura, ou seja, concentração a 0 %.

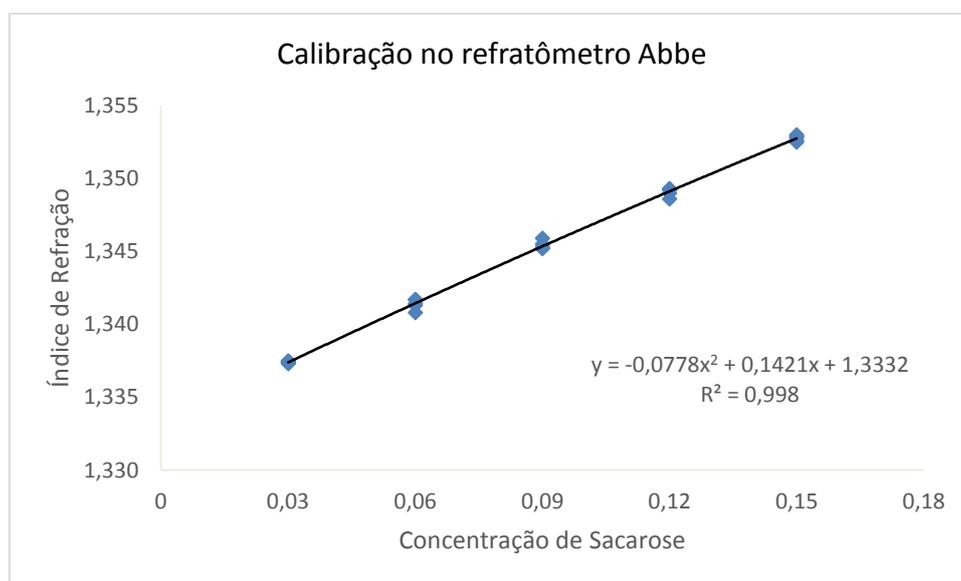


Figura 6.6: Resultado do experimento para calibração das concentrações de sacarose de 3 % a 15 %.

Após o processo de calibração das concentrações de sacarose, um experimento foi realizado para medir os índices de refração das amostras, utilizando o sensor U. A Tabela 6.5 mostra os resultados obtidos com o sensor.

Tabela 6.5: Tensões de saída medidas com o sensor U.

Ensaio #	Índice de Refração de Referência					
	1,3332	1,3374	1,3414	1,3454	1,3491	1,3528
	Tensão de Saída (V)					
Ensaio 1	4,0104	3,8334	3,6331	3,4422	3,2791	3,1021
Ensaio 2	4,0151	3,8101	3,6331	3,4282	3,2652	3,0928
Ensaio 3	4,0058	3,8055	3,6192	3,4282	3,2652	3,0928
Ensaio 4	4,0104	3,8148	3,6285	3,4328	3,2559	3,0789
Ensaio 5	3,9918	3,7962	3,6005	3,4096	3,2419	3,0742
Ensaio 6	3,9918	3,7962	3,6005	3,4096	3,2465	3,0742
Ensaio 7	3,9871	3,7868	3,5959	3,4002	3,2372	3,0649
Ensaio 8	4,0011	3,8055	3,6098	3,4096	3,2512	3,0742
Ensaio 9	3,9965	3,7962	3,6098	3,4142	3,2465	3,0789
Ensaio 10	3,9965	3,8008	3,6052	3,4096	3,2419	3,0649

A Figura 6.7 apresenta graficamente o resultado encontrado. Da mesma forma dos experimentos anteriores com índices de refração entre 1,33 e 1,39, a incerteza das medidas em volts é da ordem de 10^{-3} V e na transformação para índice de refração esta incerteza é de 10^{-4} UIR. A Tabela 6.6 apresenta as incertezas calculadas para os respectivos valores medidos. Observa-se que o sensor mediu com precisão índices de refração bem próximos ao da água pura, indicando a possibilidade de identificar concentrações de bactérias com índices próximos ao da água.

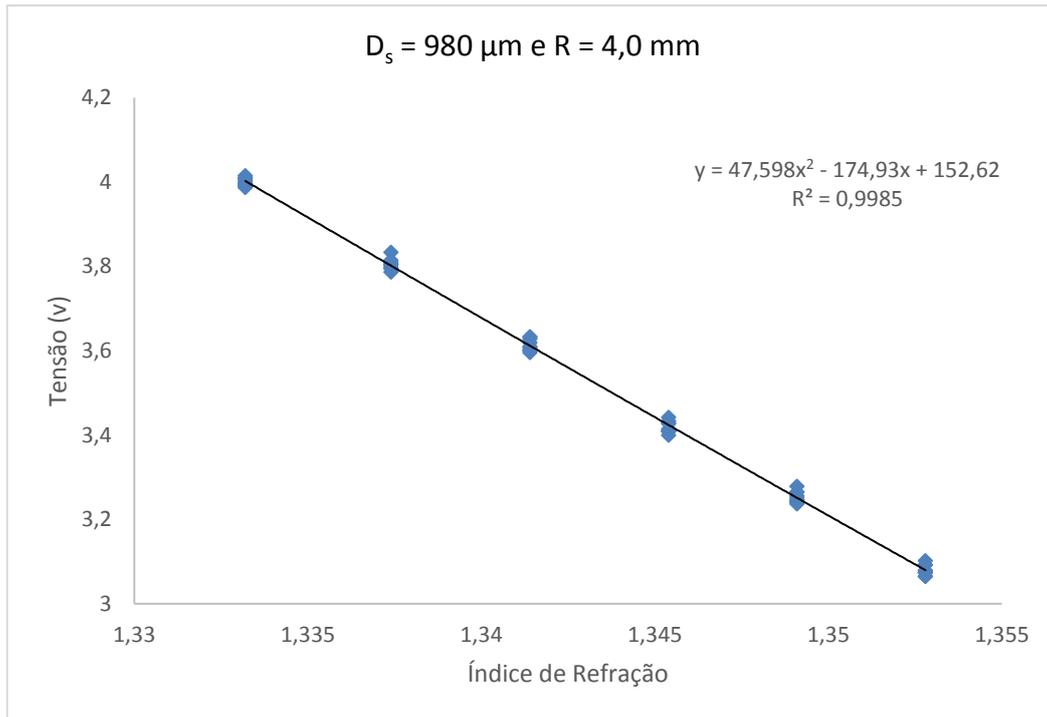


Figura 6.7: Comportamento do sensor avaliando índices de refração próximos ao da água pura.

Tabela 6.6: Incerteza da medida para tensão e índice de refração medidos com o sensor U.

Tensão de Saída (V)			IR do sensor		
3,08	±	0,02	1,3528	±	0,0004
3,25	±	0,01	1,3491	±	0,0003
3,42	±	0,01	1,3454	±	0,0003
3,612	±	0,009	1,3414	±	0,0002
3,80	±	0,01	1,3374	±	0,0003
4,00	±	0,03	1,3332	±	0,0005

6.4 Comparação entre os resultados experimentais e as simulações

A simulação realizada para fibras com diâmetros de 250 µm, 500 µm, 750 µm e 980 µm submetidas a curvas com diversos raios apresentou sensibilidades variadas de acordo com a Tabela 5.1. Para investigar experimentalmente algumas destas variações, foi realizado um experimento com fibra de 980 µm com raio de 5,0 mm. Este modelo apresentou o melhor resultado na simulação. A Figura 6.8 apresenta o resultado deste

experimento. A tensão de saída foi também normalizada na Figura 6.9 para possibilitar a comparação com o resultado da sensibilidade do sensor modelado.

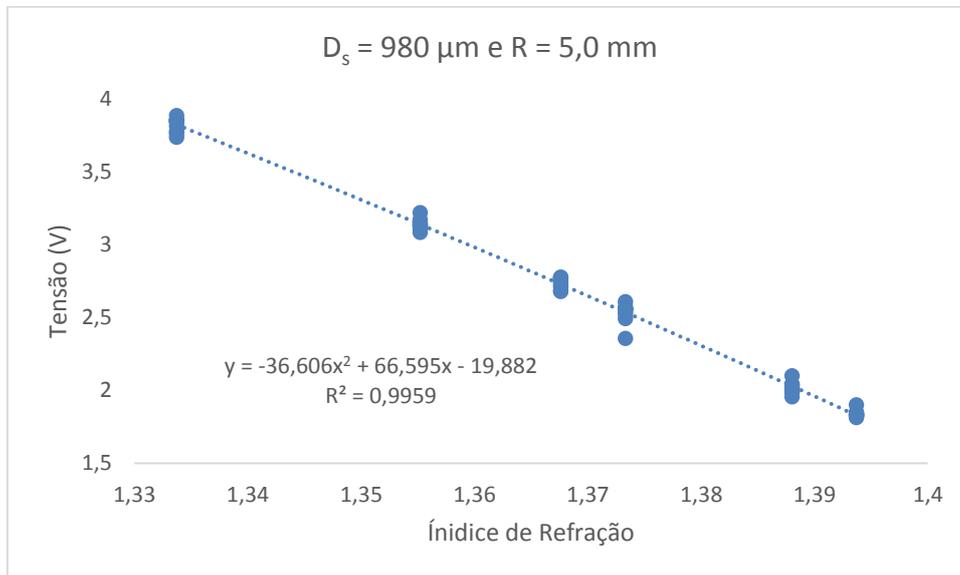


Figura 6.8: Tensão de saída em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 5,0 mm na fibra de 980 μm descascada.

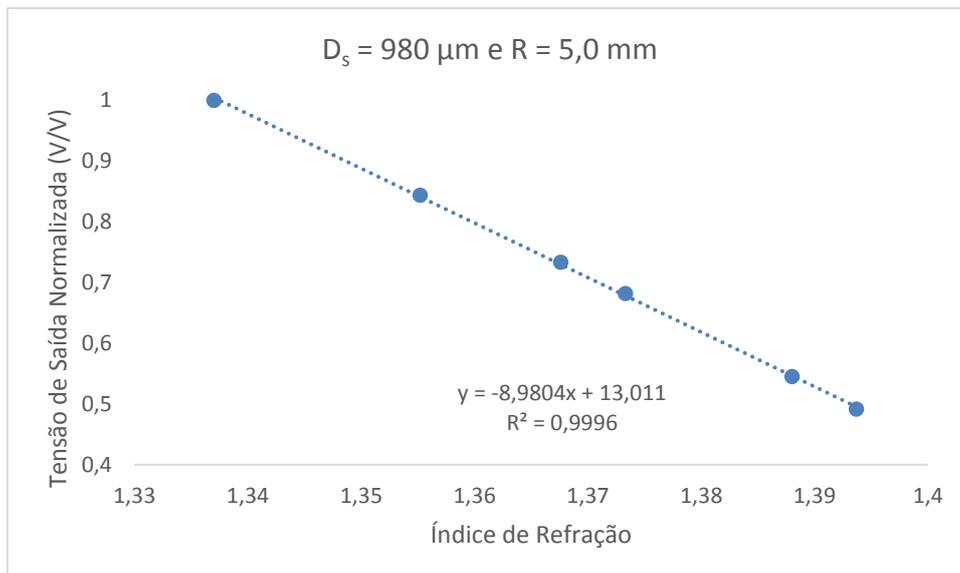


Figura 6.9: Tensão de saída normalizada em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 5,0 mm na fibra de 980 μm.

Com o objetivo de miniaturizar o sensor, foram investigados dois resultados da simulação utilizando a fibra de 250 μm. Para confirmar a baixa sensibilidade, foi confeccionado o sensor com a POF de 250 μm e raio de curvatura de 4,0 mm, utilizando-se o mesmo molde padrão dos sensores anteriormente fabricados. Como o

diâmetro desta fibra é quatro vezes menor, foram necessários ajustes no ganho do amplificador. Os mesmos processos de calibração e medidas foram realizados após os ajustes de ganho na eletrônica do sistema. A Figura 6.10 apresenta os resultados encontrados. Observa-se graficamente que as medidas apresentam variação de aproximadamente 0,05 V, elevando a incerteza da medida para ordem de grandeza de 10^{-2} V. A normalização da tensão de saída na Figura 6.11 permitiu a determinação da baixa sensibilidade de 1,71 através da primeira derivada da equação da curva de tendência.

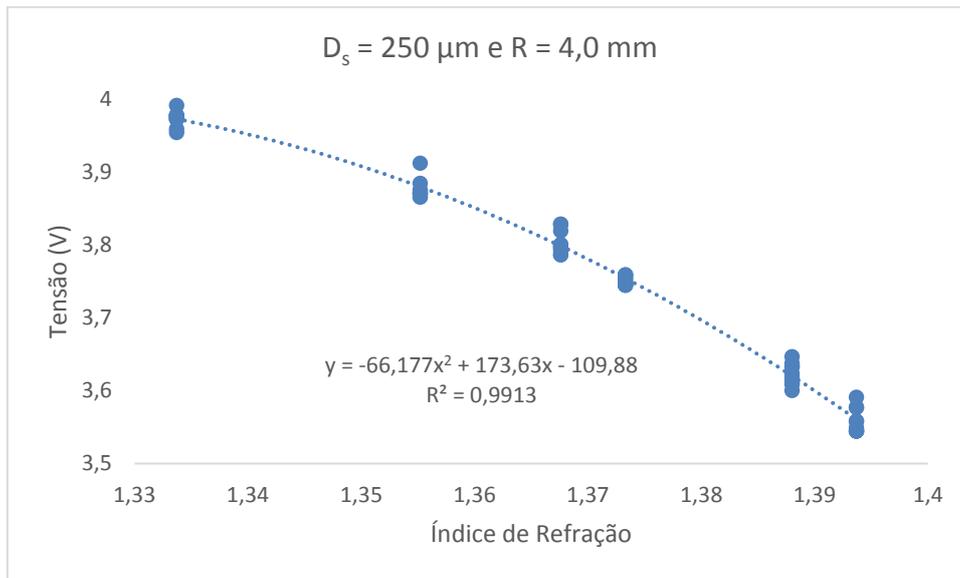


Figura 6.10: Tensão de saída em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 4,0 mm na fibra de 250 µm descascada.

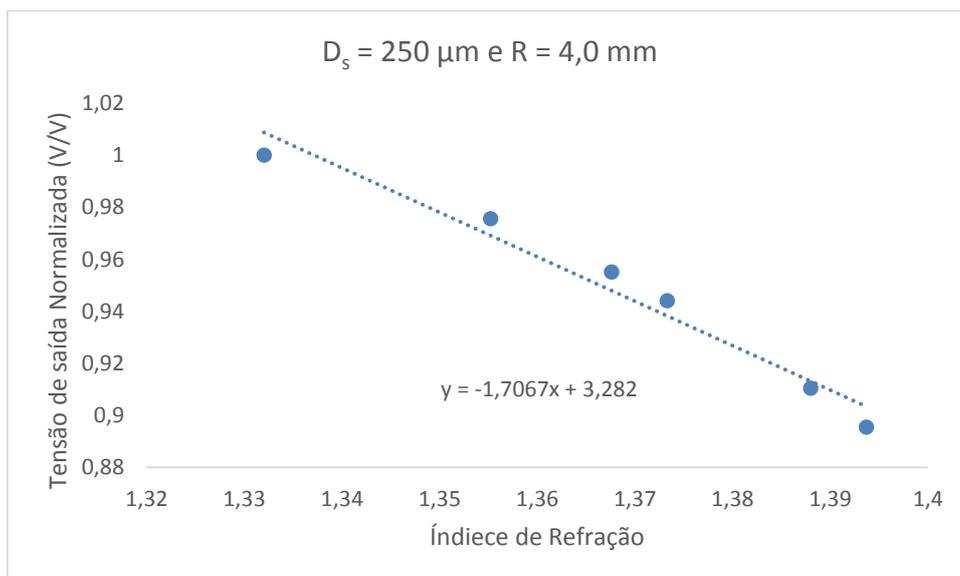


Figura 6.11: Tensão de saída normalizada em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 4,0 mm na fibra de 250 µm.

A Tabela 5.1 com as sensibilidades para a simulação do sensor com a fibra de 250 μm evidenciou que ao diminuir o raio de curvatura nesta fibra a sensibilidade aumenta. Desta forma, foi realizado um experimento com fibra de 250 μm com o raio de curvatura de 1,5 mm (Figura 6.12). A Figura 6.13 mostra os resultados normalizados em relação ao índice de refração da água pura, onde a sensibilidade calculada pela equação da curva de tendência foi de 8,03.

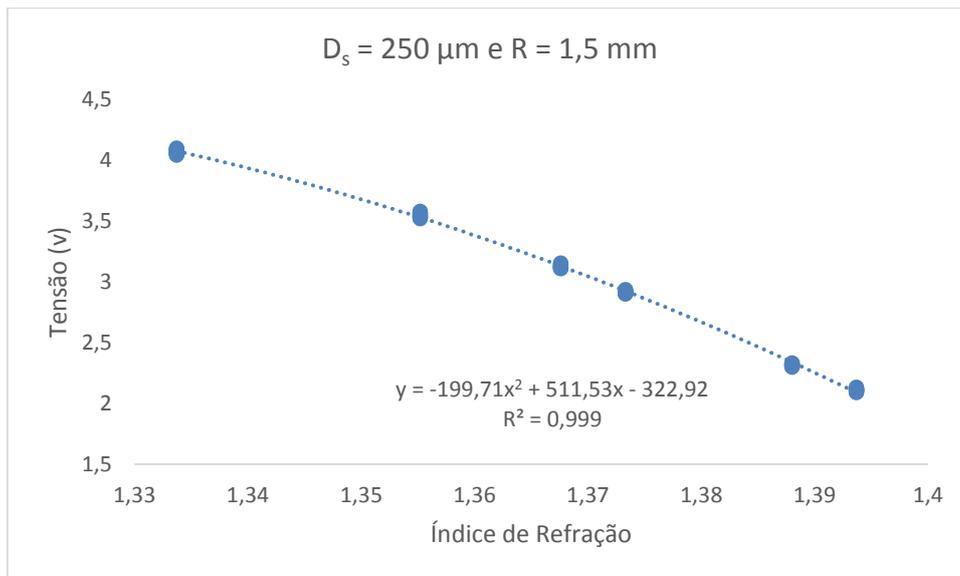


Figura 6.12: Tensão de saída em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 1,5 mm na fibra de 250 μm .

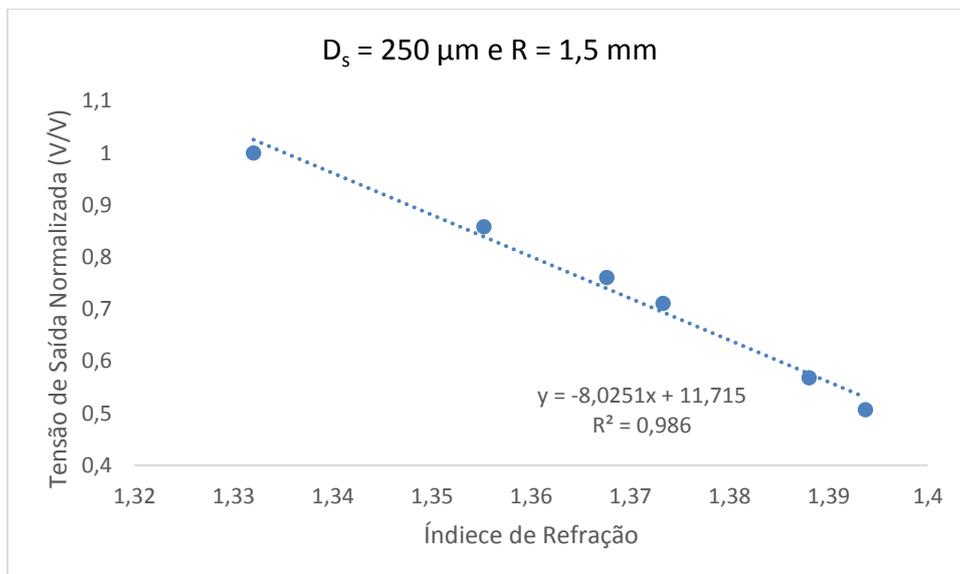


Figura 6.13: Tensão de saída normalizada em função do índice de refração para o sensor em forma de U com raio de curvatura de 1,5 mm na fibra de 250 μm .

A comparação entre os resultados experimentais apresentados e as simulações computacionais para os sensores feitos com a fibra de 980 μm pode ser analisada graficamente na Figura 6.14. Observa-se que os pontos experimentais do sensor com raio de curvatura de 5,0 mm estão mais próximos da curva simulada, tendo as sensibilidades experimentais e simuladas respectivamente iguais a 8,98 e 7,36. Os pontos experimentais do sensor com raio de 4,0 mm e os valores simulados estão mais distantes, sendo as sensibilidades experimental e simulada respectivamente iguais a 8,17 e 6,12. Estas sensibilidades podem ser melhor visualizadas para comparação na Tabela 6.7.

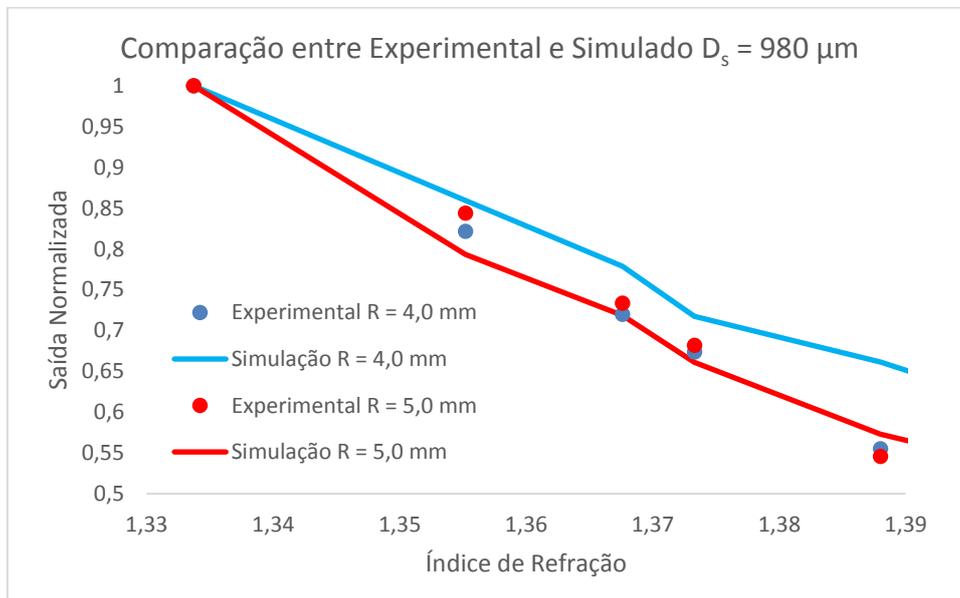


Figura 6.14: Comparação entre o experimento e a simulação dos sensores em forma de U com fibra de 980 μm descascada, com raios de 4,0 mm e 5,0 mm.

A Figura 6.15 apresenta a comparação entre as sensibilidades encontradas na simulação e a sensibilidade do sensor no experimento realizado com a fibra de 250 μm . Observa-se uma maior compatibilidade das curvas em comparação aos sensores com fibra de 980 μm , mostrando a possibilidade da miniaturização do sensor sem perda da sensibilidade. As sensibilidades calculadas a partir dos valores experimentais e simulados para o sensor de raio 1,5 mm foram, respectivamente, 8,03 e 7,30. Para o sensor de raio 4,0 mm as sensibilidades foram de 1,71 e 2,37, respectivamente para os valores experimentais e simulados.

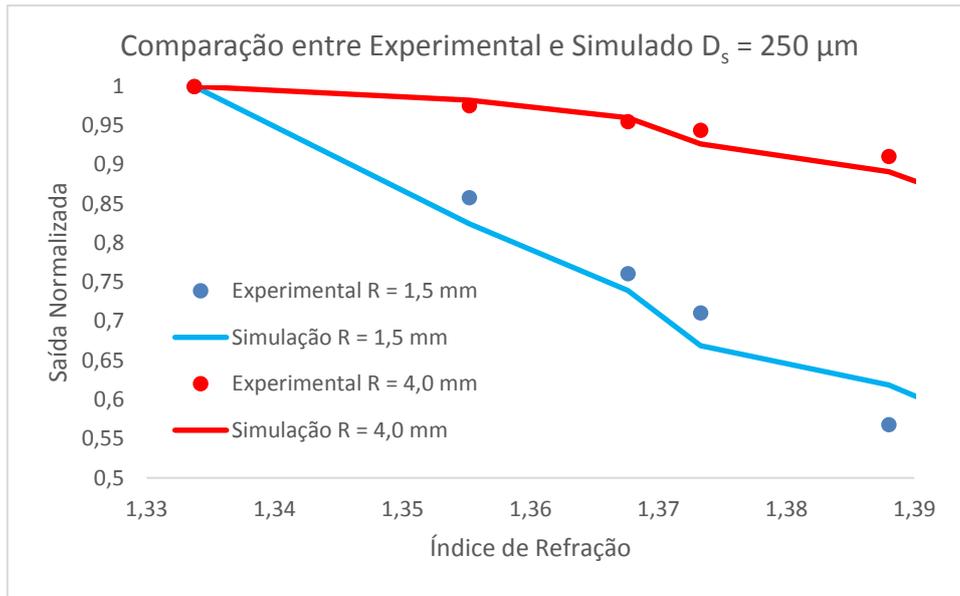


Figura 6.15: Comparação entre o experimento real e a simulação dos sensores em forma de U com fibra de 250 μm , com raios de 1,5 mm e 4,0 mm.

O módulo da diferença entre os valores das sensibilidades medidas experimentalmente e simuladas pode ser visto na Tabela 6.7 representado pela letra Δ . Observa-se que essa diferença é maior para o sensor com fibra de 980 μm . A diferença entre valores experimentais e simulados pode ser causada por truncamentos realizados nos programas de simulação. Considera-se também que as simulações realizadas foram todas em duas dimensões, o que não revela as condições reais e tridimensionais dos sensores, mas pode ser considerado um passo importante para a elaboração de novos modelos no futuro. Não foram realizados experimentos com a fibra de 250 μm e raio de 5,0 mm, nem com a fibra de 980 μm e raio de 1,5 mm, por isso estes valores não constam na tabela.

Tabela 6.7: Comparação das sensibilidades das simulações com os resultados experimentais

Raio da curva (mm)	Fibra de 250 μm			Fibra de 980 μm		
	Simulação	Experimental	Δ	Simulação	Experimental	Δ
1,5	7,30	8,03	0,73	-	-	-
4,0	2,37	1,71	0,66	6,12	8,17	2,05
5,0	-	-	-	7,36	8,98	1,62

Capítulo 7

Resultados e discussão do imunossensor

7.1 Análises preliminares do imunossensor

7.1.1 Análise microscópica da presença do anticorpo

Uma análise utilizando microscopia confocal foi realizada em parceria com o Grupo de Pesquisa em Nanoneurobiofísica da UFSCar em Sorocaba, visando a análise da superfície com casca e descascada dos sensores. Na preparação das amostras, os sensores foram funcionalizados com o mesmo protocolo realizado para as medições do imunossensor. A seguir foram imersos por 1 hora em BSA e sequencialmente deixados por 2 horas imersos no anticorpo marcado (Alexa 488 e 430). Os sensores foram então lavados três vezes em tampão PBS e observados ao microscópio confocal.

A Figura 7.1 mostra a imagem sobreposta de uma reconstrução 3D de 200 μm da POF com anticorpo marcado para *E. coli* com Alexa 488 (pseudo-cor verde). Esse anticorpo conjugado permite através da fluorescência a identificação da presença do anticorpo na fibra. Na esquerda observa-se a fibra descascada e na direita a fibra com casca. Ambas apresentaram sinal de fluorescência forte. Os quadrados inseridos na Figura 7.1 descrevem as áreas de $2,0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ cada, submetidas à avaliação de intensidade fluorescente.

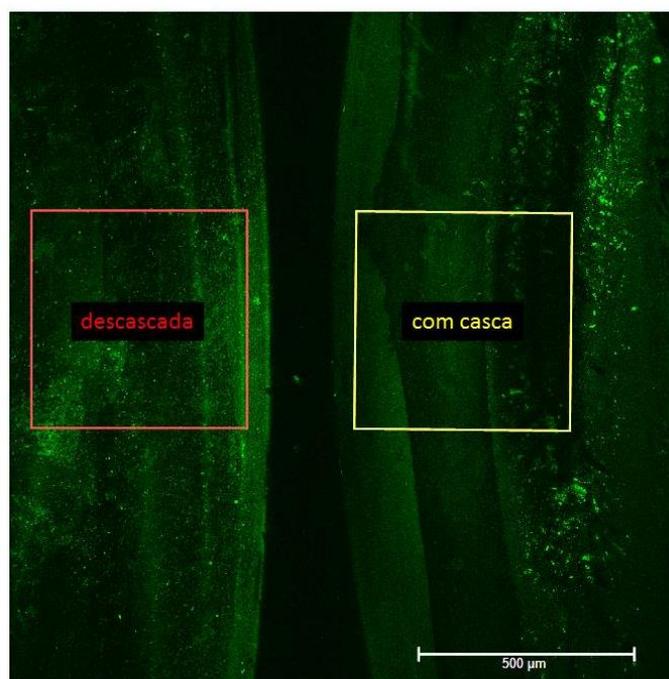


Figura 7.1: Microscopia confocal das fibras descasca e com casca.

Na Figura 7.2 tem-se o histograma com os resultados calculados pelo programa do microscópio. A análise revelou que ambas as amostras (com casca ou descascada) apresentaram intensa emissão de sinal. Entretanto, a comparação entre os sinais de intensidade de fluorescência, calculada de acordo com a relação de diferença entre o sinal global de emissão de intensidade em ambas as amostras, revelou que a POF descascada apresenta um sinal 40 % mais intenso em comparação com a POF com casca.

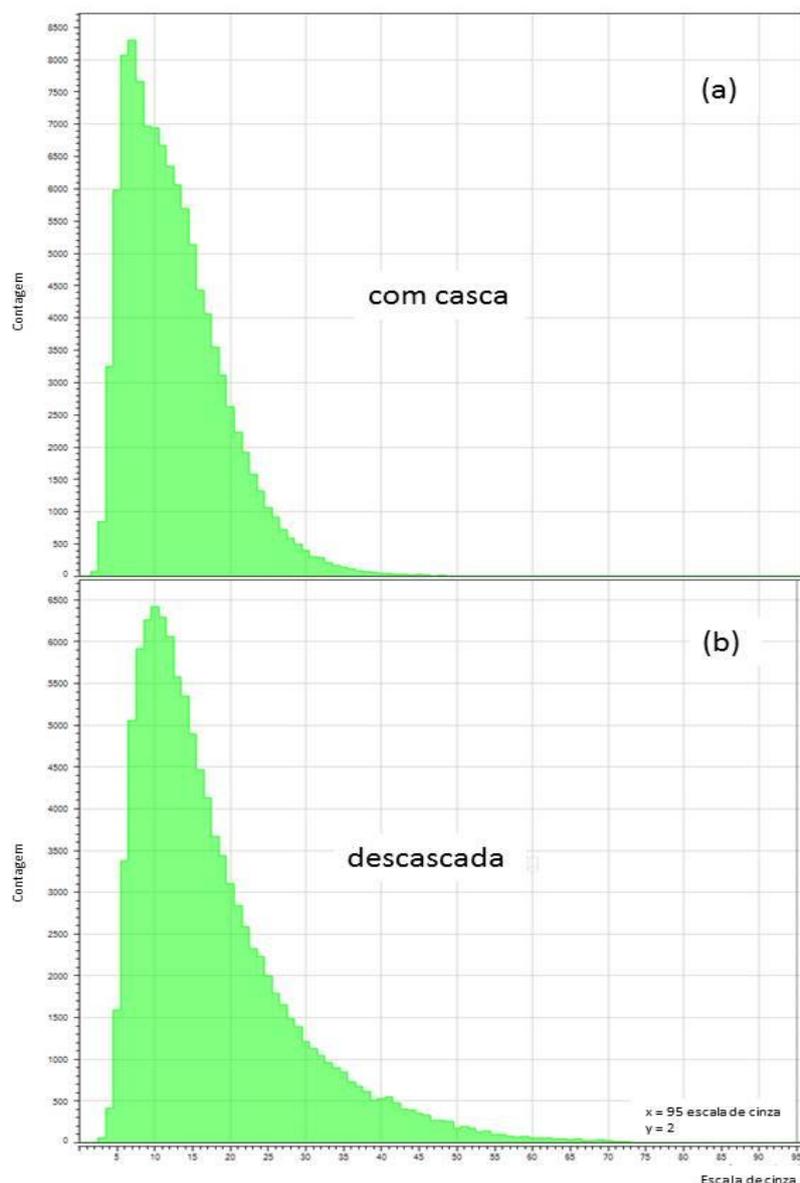


Figura 7.2: Histograma da microscopia utilizando o confocal. (a) Fibra com casca; (b) Fibra descascada.

Tais diferenças podem ser atribuídas às diferenças na composição química de cada amostra. O HMDA tem forte afinidade para as superfícies de PMMA [33]. Já o material da casca à base de flúor pode ter criado uma barreira ao processo, afetando a funcionalização e, conseqüentemente, a marcação fluorescente secundária. A fibra com casca ainda preserva propriedades que viabilizaram a funcionalização com *anti-E. coli*, porém com sinal menos intenso. Estes resultados apresentados reafirmam a importância da remoção da casca antes da funcionalização do imunossensor.

7.1.2 Análise microscópica da presença da *E. coli*

A microscopia confocal não permite a visualização da bactéria na POF. Para a visualização das bactérias fixadas nas POF com casca e sem casca foi realizada uma microscopia utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do CENABIO-UFRJ. Um preparo minucioso da amostra para a utilização do MEV precisou ser realizado para permitir a visualização da bactéria em seu formato natural. Foi realizado o protocolo descrito a seguir que envolve os processos de desidratação, ponto crítico e metalização.

Inicialmente, realizou-se a fixação da amostra utilizando glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, misturado na proporção 1:10 por 2 horas a temperatura ambiente. Logo após, foi feita a lavagem do material em tampão fosfato de sódio, 0,2 M, pH 7,2, mais sacarose para corrigir molaridade (foram lavadas três vezes por 30 minutos cada).

No procedimento para desidratação foram realizados banhos de Etanol em série crescente, de: 30 % durante 20 minutos; 50 % durante 20 minutos; 70 % durante 20 minutos; 80 % durante 20 minutos; 95 % durante 20 minutos; 100 % 2 vezes durante 30 minutos. Durante a troca a amostra foi mantida sempre coberta pela solução alcoólica. A solução alcoólica foi retirada e colocada simultaneamente em todas as trocas.

O processo de ponto crítico a seguir, permite a retirada de toda água do tecido. Ele dura cerca de 40 minutos na câmara de ponto crítico (em inglês CPD-*Critical Point Dryer*). Levou-se a amostra já fixada e completamente desidratada à Câmara de Ponto Crítico, em um pequeno volume de etanol absoluto. Com a Câmara isolada, injetou-se o CO₂ líquido, fazendo-se várias substituições até a remoção total do etanol. Elevou-se então a temperatura da câmara até 40-45 °C, bem acima da temperatura crítica. Com o aumento gradual da temperatura, as moléculas adquirem energia cinética e se convertem em gás, o que faz aumentar simultaneamente a pressão interna da câmara. À medida que isso ocorre, a densidade da fase líquida é reduzida, e a fase gasosa é aumentada. Nesta situação, a tensão linear é igual a zero e todo líquido se converte em gás. Assim evita-se o efeito da tensão linear sobre as amostras. Após isto ela foi removida da Câmara seca e pronta para ser coberta com ouro. O dióxido de carbono é inerte e barato por isso foi adotado no método. O grau de pureza máxima do fluido é essencial para evitar contaminações.

A amostra preparada foi colocada no suporte e presa com fita dupla face para aderir à amostra.

No processo de metalização foi depositada uma fina camada de ouro sobre a amostra com cerca de 20 nm a 30 nm de espessura, através de um sistema de evaporação conhecido como “*sputtering*”. Após o procedimento os suportes foram mantidos com as amostras em dissecador até a observação no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

O procedimento descrito foi realizado para fibras descascadas com diâmetro de 980 μm e fibras fabricadas sem casca com diâmetro de 1000 μm , ambas com raio da curva de 4,0 mm. A Figura 7.3 mostra a microscopia da fibra descascada, com quatro ampliações no MEV, com réguas de calibração da medida de 2,0 mm, 300 μm , 50 μm e 20 μm . Observa-se que as bactérias cobrem apenas uma pequena parte da fibra, formado uma faixa de captura.

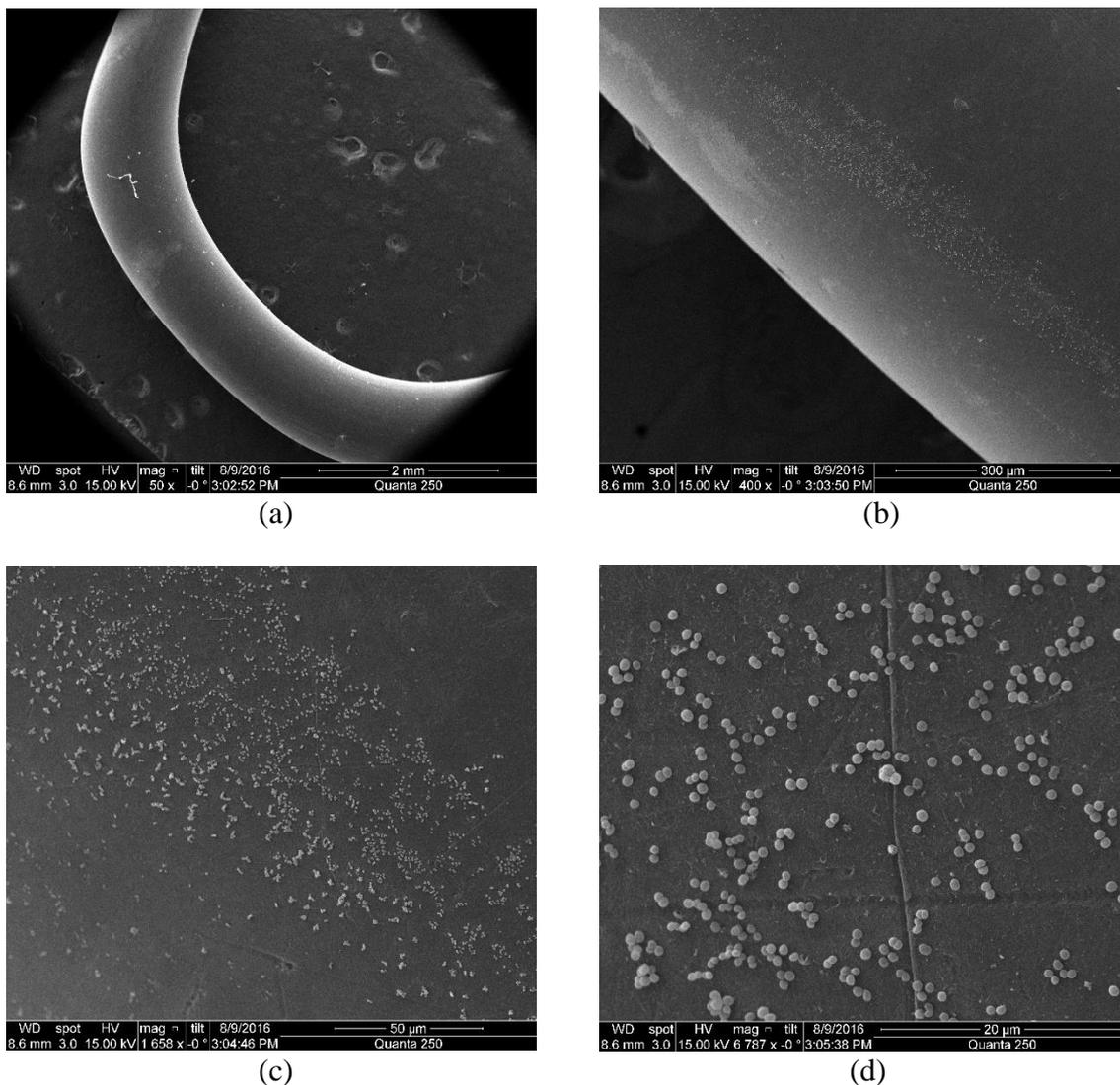


Figura 7.3: Microscopia eletrônica de varredura do imunossensor descascado após capturar bactérias por 40 minutos. Imagens calibradas em: (a) 2,0 mm; (b) 300 μm ; (c) 50 μm e (d) 20 μm .

A fibra POF fabricada sem casca apresentou deformações em sua superfície observada com o MEV. A Figura 7.4 mostra o resultado desta microscopia da fibra sem casca. As deformações apresentadas foram causadas pelo processo de desidratação, em que a fibra foi exposta a uma solução de etano até 100 %. Independente da deformação é possível observar na sequência com régua de calibração da medida de 2,0 mm, 100 μm , 20 μm e 5 μm , que este sensor possui uma concentração maior de bactérias em sua superfície, comparado a microscopia do sensor descascado.

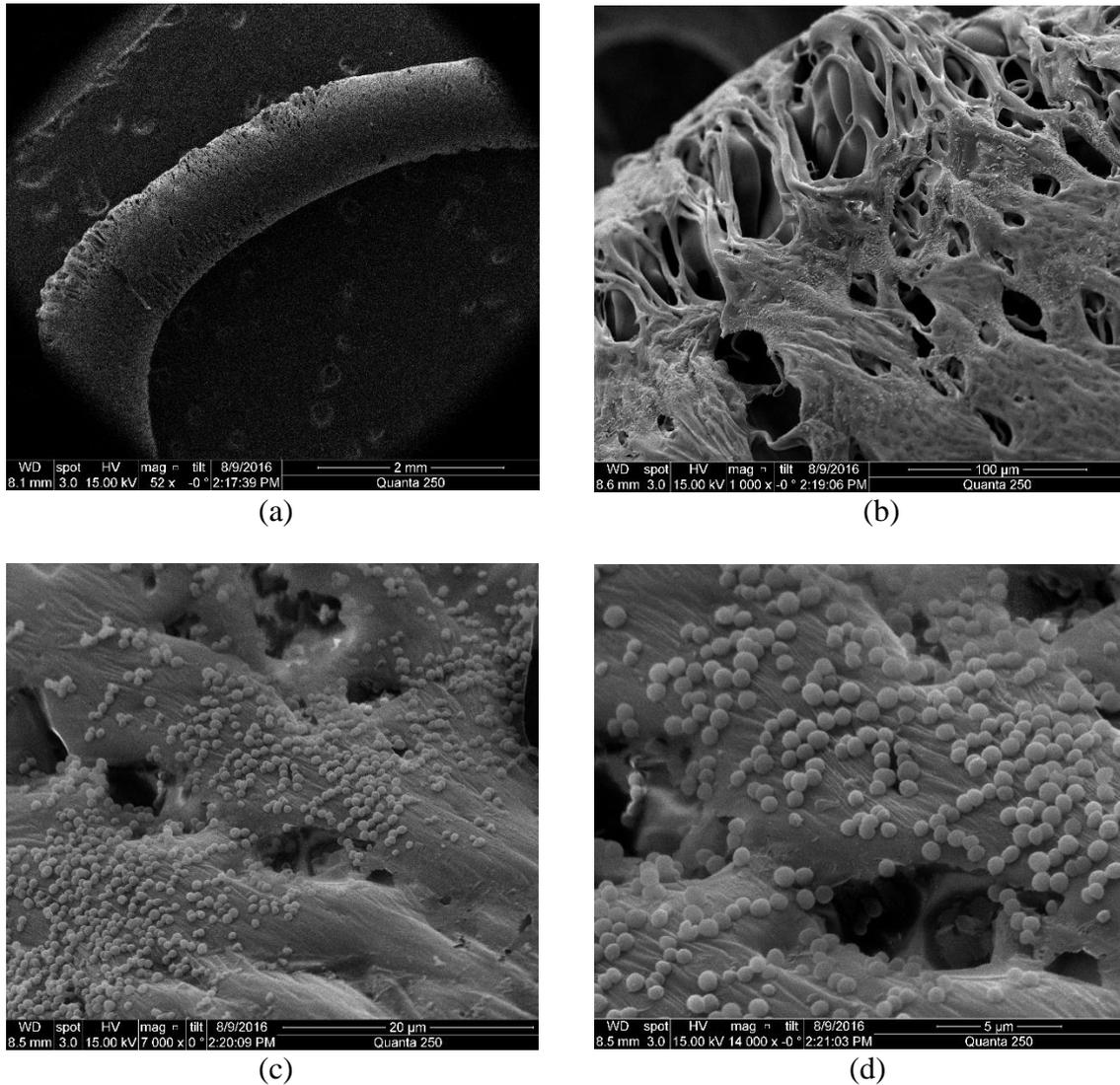


Figura 7.4: Microscopia eletrônica de varredura do imunossensor sem casca após capturar bactérias por 40 minutos. Imagens calibradas em: (a) 2,0 mm. (b) 100 μm. (c) 20 μm. (d) 5 μm.

7.1.3 Análise das propriedades da POF por espectroscopia de infravermelho

A absorvância, capacidade intrínseca dos materiais em absorver radiações em frequências específicas, é frequentemente usada na análise da composição dos materiais. Quando o material absorve a radiação, pode-se considerar que seu índice de refração tenha uma parte imaginária que represente na equação de onda um termo de amortecimento da energia.

Desta forma, um experimento foi realizado para investigar as propriedades das fibras ópticas utilizadas nos sensores e suas alterações durante o processo de funcionalização. Utilizando-se a espectroscopia de infravermelho, realizada no

Laboratório de Caracterização de Superfície da UFRJ, pode-se observar nas etapas de PMMA puro e PMMA funcionalizado com HMDA e depois com Glutaraldeído, um pico de absorbância em 1716 cm^{-1} , no espectro da Figura 7.5. Este pico é característico do próprio PMMA ($\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8$). A espectroscopia não detectou mudanças significativas na estrutura da fibra após as etapas de funcionalização com o HMDA e o Glutaraldeído.

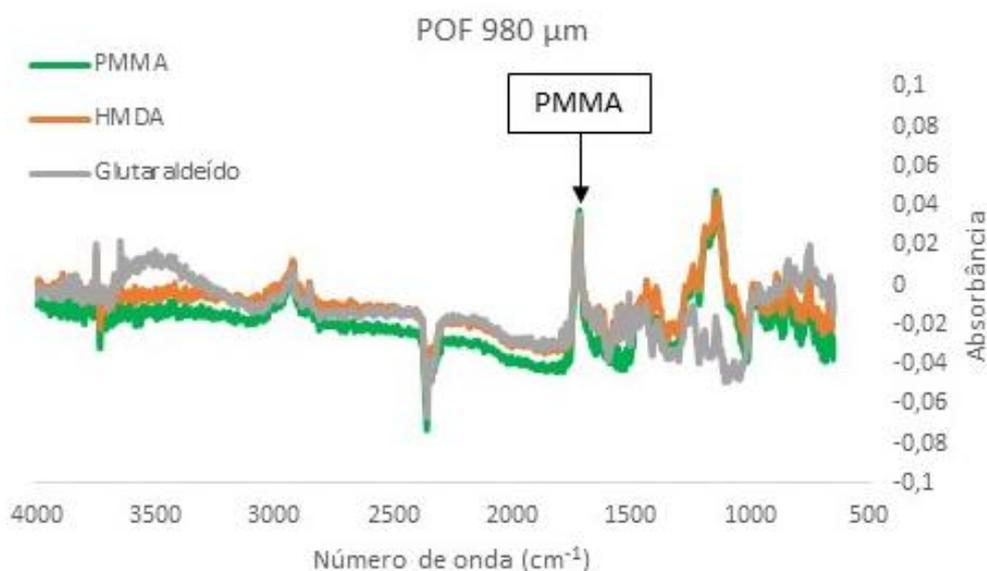


Figura 7.5: Espectroscopia de infravermelho da POF de $980\text{ }\mu\text{m}$, realizada nas etapas de PMMA puro, e funcionalizada com HMDA e Glutaraldeído.

As etapas que consistem de anticorpo e bactéria (Figura 7.6) apresentaram uma banda larga de absorbância entre 3700 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} . Essa banda é característica da presença de água, não demonstrando mudanças estruturais na fibra. O aumento da absorbância na região entre 1000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} também é característica da assinatura da presença de meio aquoso.

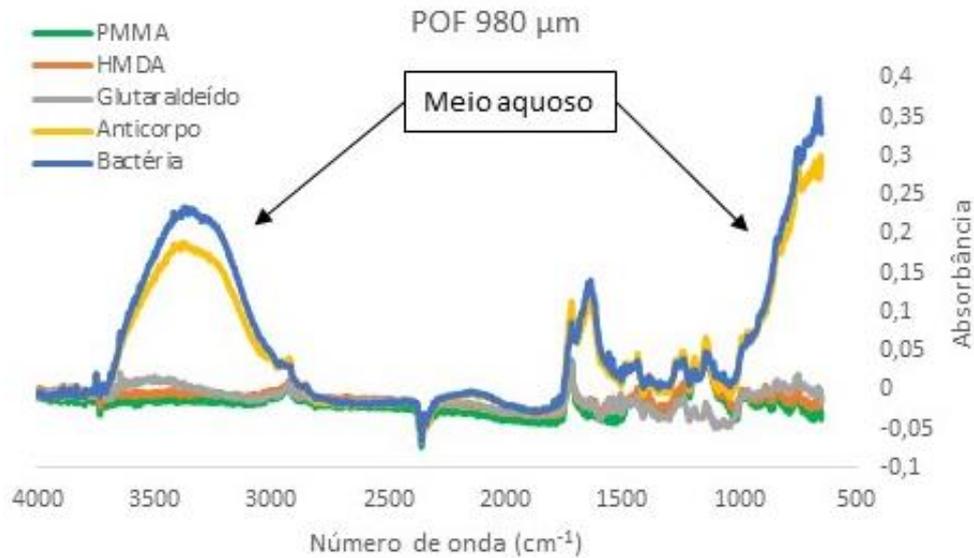


Figura 7.6: Espectroscopia de infravermelho da POF de 980 µm, realizada nas etapas de PMMA puro, e funcionalizada com HMDA, Glutaraldeído e imobilizada com o anticorpo. Logo após a fibra foi imersa por 40 minutos em suspensão de *E. coli* com concentração de 10^8 UFC/ml.

Foi realizada a espectroscopia da POF com 250 µm de diâmetro para investigação da estrutura da sua superfície. O espectro encontrado pode ser observado na Figura 7.7, onde o espectro da POF de 980 µm foi juntamente colocado. O pico de absorvância em 1716 cm^{-1} , referente ao PMMA, alcança 0,05, sendo menor do que os picos de absorvância em 1174 cm^{-1} e 878 cm^{-1} , característicos do fluoreto de polivinilideno (PVDF – $\text{C}_2\text{H}_2\text{F}_2$). Este material é provavelmente utilizado como revestimento da fibra e, não sendo PMMA puro, dificulta o processo de funcionalização desenvolvido para o PMMA. A presença deste material justifica o mau funcionamento do experimento do imunossensor utilizando esta fibra com 250 µm de diâmetro.

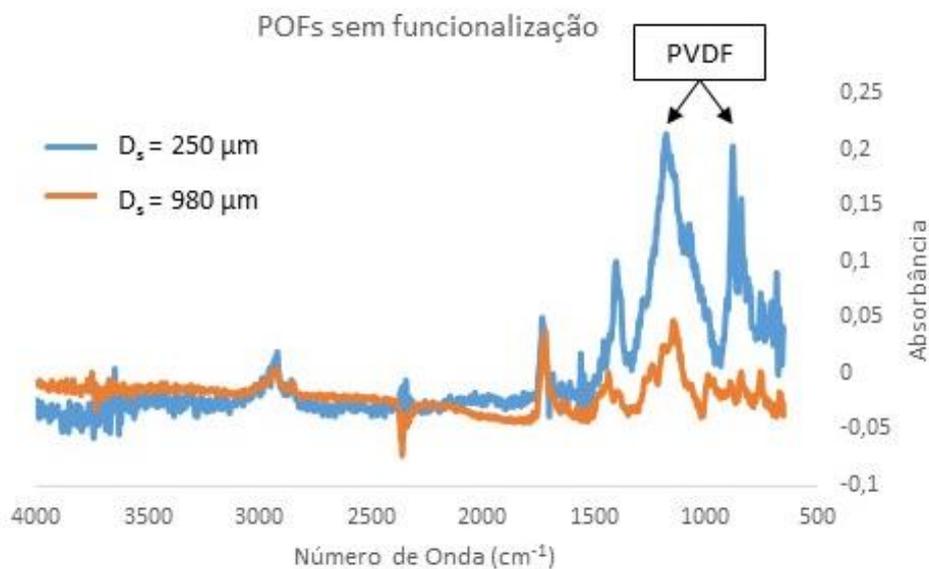


Figura 7.7: Espectroscopia de infravermelho da fibra de 980 μm e de 250 μm para identificação das características da sua superfície.

7.2 Ensaios com imunossensores

7.2.1 Resultados do imunossensor com o sistema com Amplificador Lock-in

Nos estudos realizados anteriormente no LIF com sensores em forma de U para refratometria [11], o sensor com casca foi inicialmente escolhido para experimentos com bactérias, pois, para as medidas de índice de refração, apresentou uma sensibilidade bem próxima do sensor sem casca e sua fabricação era mais acessível por ser feito com fibra comercial. A Figura 7.8 apresenta os resultados alcançados para suspensões bacterianas com concentrações de 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC/ml, além do controle em salina. Esses resultados foram encontrados com o sistema que utilizava um amplificador *Lock-in*. As medidas realizadas para concentrações de 10^8 UFC/ml apresentam uma atenuação de aproximadamente 7 % da saída normalizada. As medidas para concentrações de 10^4 e 10^6 UFC/ml não podem ser distinguidas até os primeiros 20 minutos, alcançando a partir deste ponto 2 % e 3 % de atenuação respectivamente. A incerteza das medidas mostra uma grande variação entre os resultados encontrados.

Estes resultados são parâmetros importantes para o presente trabalho, visando-se alcançar melhorias no processo de funcionamento do imunossensor, tanto na avaliação e desenvolvimento do sistema eletrônico, quanto dos processos químicos e biológicos que envolvem a detecção das bactérias.

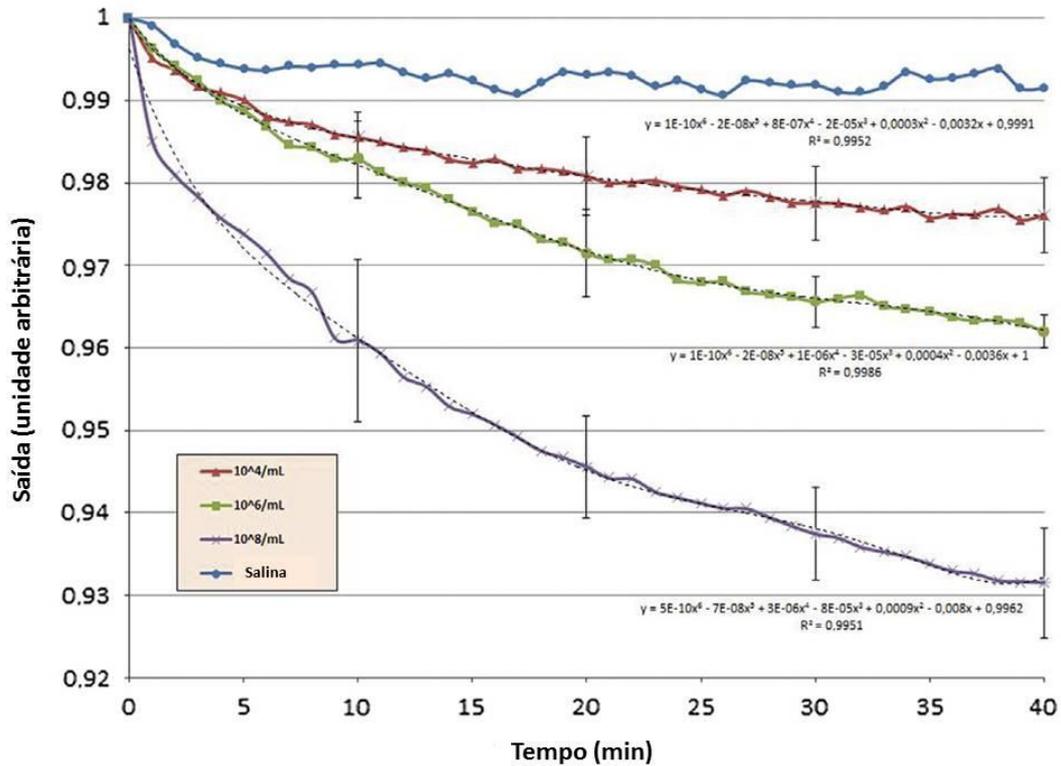


Figura 7.8: Resultados dos experimentos com *Escherichia coli* O55 para concentrações de 10⁴, 10⁶ e 10⁸ UFC/ml e solução salina como controle negativo, utilizando o amplificador *Lock-in*. POF de 1000 μm com raio de curvatura de 4,0 mm. Figura adaptada de [2].

7.2.2 Resultados do imunossensor com a plataforma Arduino e o protocolo 1

O setup implementado com a plataforma Arduino e um sensor de referência apresentou resultados compatíveis com o sistema utilizando o Amplificador *Lock-in* em todo o processo de calibração. Este sistema eletrônico é portátil, e a utilização de um sensor não funcionalizado inserido na água contaminada e medido simultaneamente como referência permitiu uma análise mais segura dos resultados biológicos. Inicialmente, sensores em forma de U com casca, descascados e fabricados sem casca foram testados para comparação dos resultados.

A Figura 7.9 apresenta o resultado do sensor com casca. Estes sensores não apresentam regularidade no processo de funcionalização, desta forma, apenas um sensor apresentou variação no processo de medida.

O resultado encontrado apresentou uma atenuação da saída normalizada de mais de 5 % para soluções bacterianas concentradas a 10⁴ UFC/ml, sendo melhor do que os resultados de 3 % apresentados no experimento com Amplificador *Lock-in* mostrados na Figura 7.8.

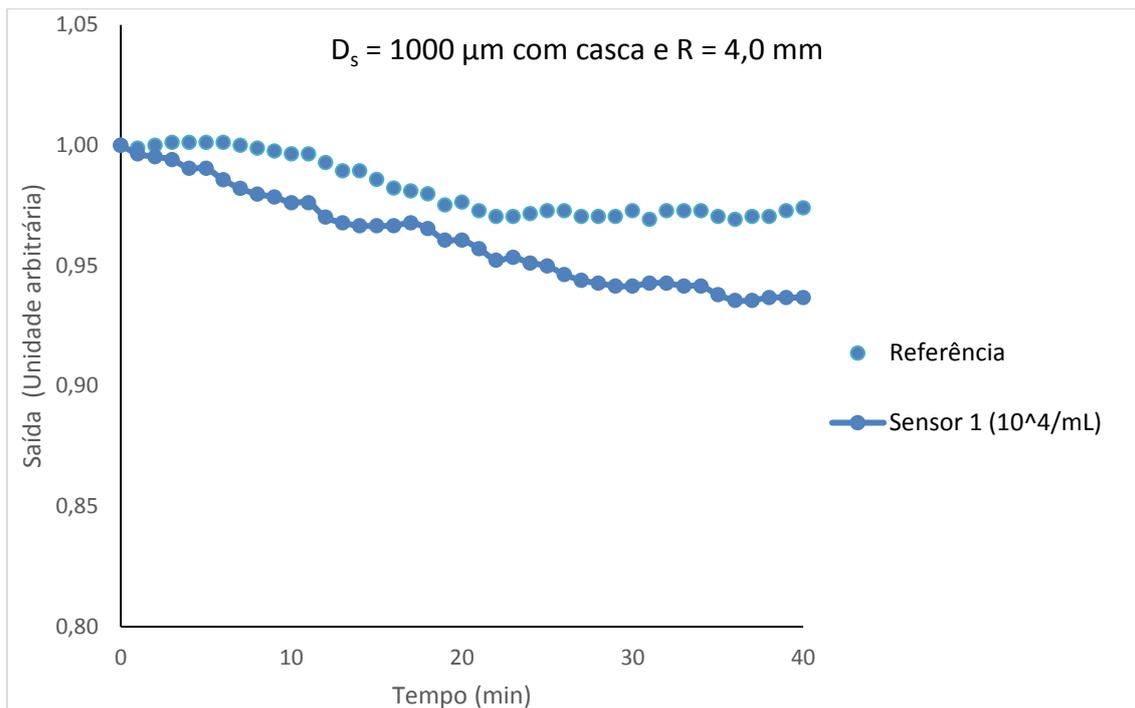


Figura 7.9: Detecção de bactéria em água com 10^4 UFC/ml utilizando sensor U com casca e o sistema com sensor de referência.

Novos experimentos foram realizados agora com o sensor dentro da estufa, onde a temperatura e a umidade ambiente puderam ser monitoradas. Em cada experimento foram utilizados cinco sensores, investigando-se concentrações 10^4 UFC/ml e 10^6 UFC/ml. Utilizando-se este primeiro protocolo, alguns sensores não apresentaram resultados na captura de bactérias. A Figura 7.10 mostra os resultados para os sensores 3 e 4 com casca. O sensor 3 apresentou uma atenuação para a saída normalizada de 8 % para a concentração de 10^6 UFC/ml. Os sensores imersos nas concentrações de 10^4 UFC/ml não apresentaram resultados. Durante a realização dos experimentos a temperatura ambiente era de 26 °C e a umidade relativa do ar de 40 %.

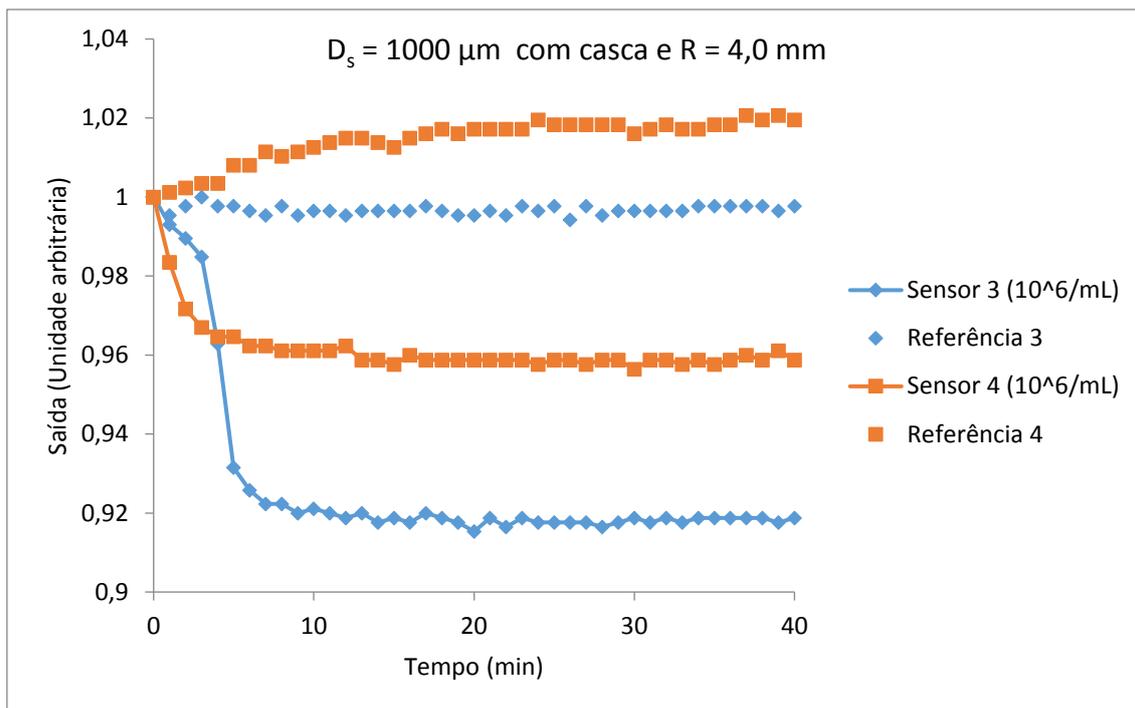


Figura 7.10: Detecção de bactéria em água com 10^6 UFC/ml utilizando sensor U com casca e o sistema com sensor de referência. Experimentos realizados na estufa com temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade de 40% .

Sensores descascados foram experimentados após a realização do processo de funcionalização. A Figura 7.11 apresenta os resultados destes imunossensores descascados com suas respectivas referências. Diferente dos sensores com casca, os 3 sensores utilizados apresentaram variação no nível do sinal de saída. Comparando-se com os resultados do sistema utilizando o Amplificador *Lock-in* (Figura 7.8), nota-se que os valores de atenuação da saída normalizada para concentrações de 10^4 UFC/ml são de 3% , enquanto neste novo experimento, os valores obtidos foram de 20% . Entretanto, as atenuações que ocorrem perto de 20 minutos no sensor 2 e perto de 35 minutos no sensor 3 não foram observadas em outros experimentos. Os sensores de referência, porém, não apresentaram variações nestes instantes, o que demonstra a estabilidade da eletrônica.

O processo de remoção da casca não deixa a superfície da fibra uniforme. Alguns resíduos de casca são encontrados principalmente na interface entre a região com casca e descascada. Estes resíduos podem estar proporcionando acúmulo de anticorpo, impedindo a captura das bactérias de maneira uniformemente distribuída sobre a superfície da fibra.

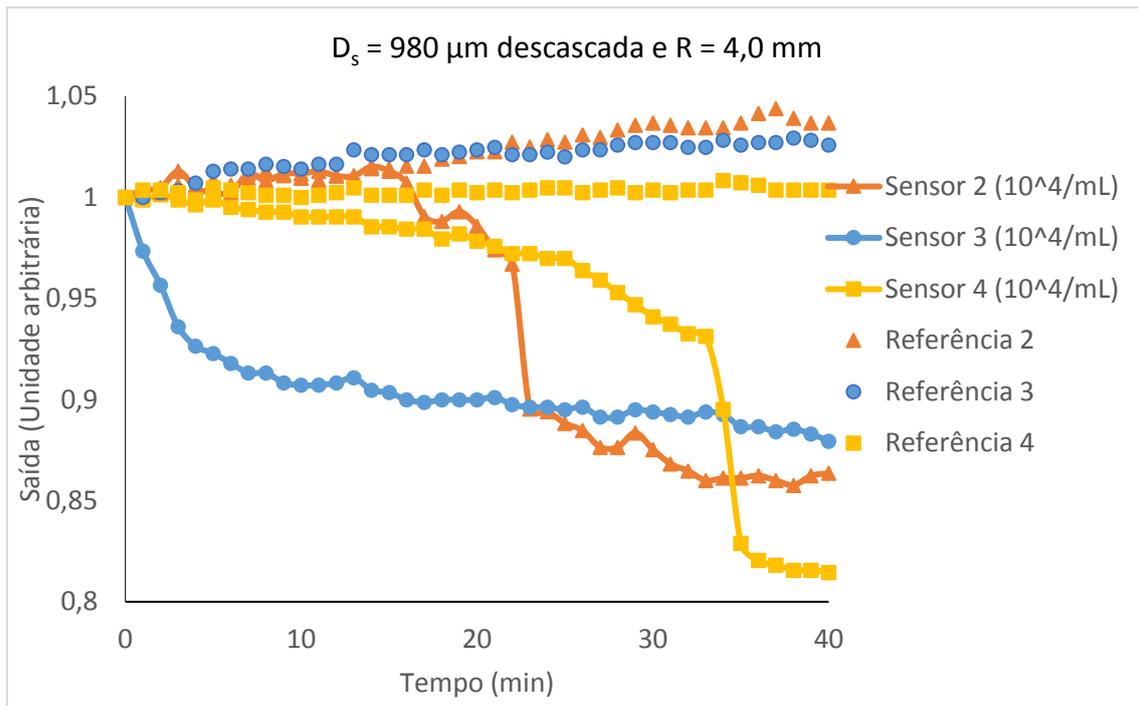


Figura 7.11: Detecção de bactéria em água com 10^4 UFC/ml utilizando sensor U descascado e o sistema com sensor de referência.

Em função do acúmulo de resíduos nos sensores descascados por processo químico, outros sensores foram fabricados com POF sem casca. A ausência da casca faz com que toda a fibra, e não somente a curva, seja sensível a variação do índice de refração do meio externo. Desta forma, faz-se necessário um controle maior do volume da região imersa na amostra.

A Figura 7.12 apresenta os resultados do experimento utilizando o sensor sem casca para medidas de concentrações de 10^4 UFC/ml. A distribuição das bactérias neste sensor é mais uniforme, pois este é feito de PMMA e não possui a casca com material fluoretado. Apenas 2 sensores apresentaram resultados, sendo o melhor com atenuação de 6 % para a concentração de 10^4 UFC/ml. Este resultado supera os sensores com casca e descascados anteriormente experimentados. Durante a realização dos experimentos a temperatura ambiente ficou entre $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $26 \text{ }^\circ\text{C}$ e a umidade entre 42 % e 44 %.

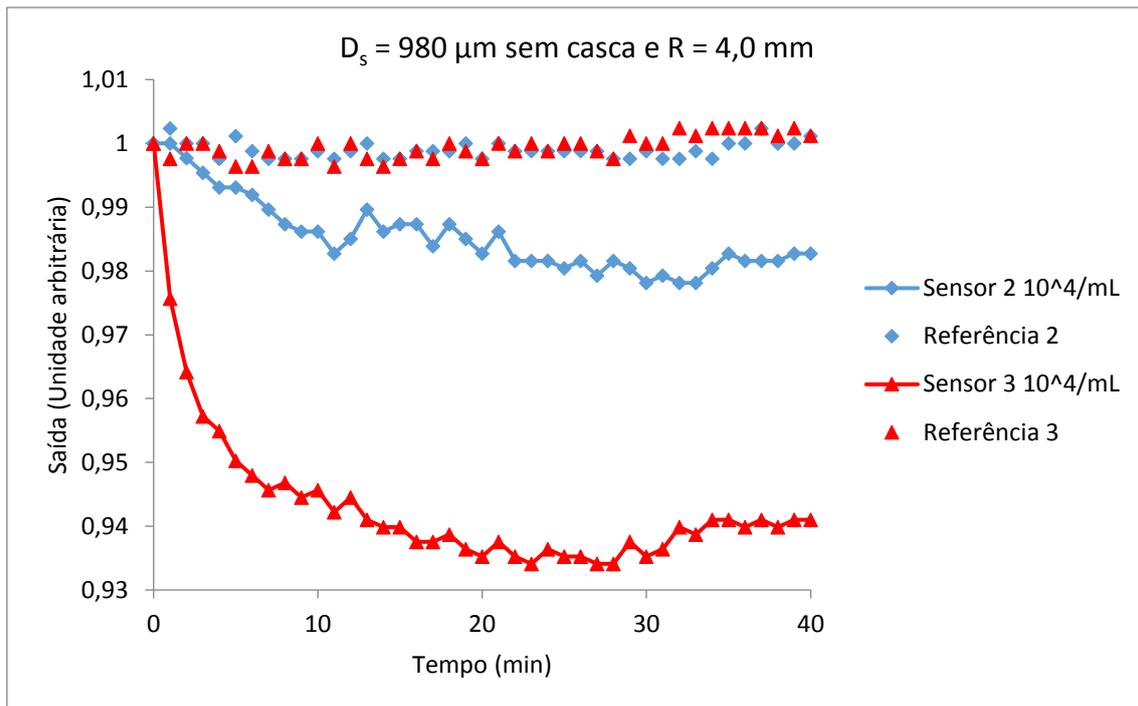


Figura 7.12: Reconhecimento de bactéria em água com 10⁴ UFC/ml utilizando sensor U sem casca e o sistema com sensor de referência. Experimentos realizados na estufa com temperatura entre 25°C e 26 °C e umidade entre 42% e 44%.

Foram realizados experimentos com a amostra em agitação constante, visando aumentar a probabilidade das bactérias passarem pela região sensora. Entretanto, as oscilações aumentaram e os experimentos não apresentaram resultados compatíveis que pudessem ser analisados.

7.2.3 Resultados do imunossensor com a plataforma Arduino e o protocolo 2

Considerando-se as dificuldades na captura das bactérias, foram realizadas alterações no protocolo biológico. Os resultados apresentados nesta seção foram encontrados com os imunossensores que passaram pelo tratamento com H₂SO₄ por 2 horas e a etapa do HMDA alterada para 24 horas.

A Figura 7.13 apresenta os resultados para o protocolo 2 em suspensões bacterianas concentradas a 10⁸ UFC/ml. Apesar das atenuações na saída normalizada alcançarem apenas 7 %, os resultados são mais estáveis, com todos os 5 sensores utilizados apresentando atenuações nas saídas. A partir dos 35 minutos é possível notar que alguns sensores apresentam uma estabilização, o que indica que as bactérias não estão mais sendo capturadas. Considerando-se a alta concentração da suspensão

bacteriana, esta estabilização está sendo provocada pela interrupção da atividade do anticorpo. Observa-se com isso que o processo de funcionalização do imunossensor continua sendo um desafio.

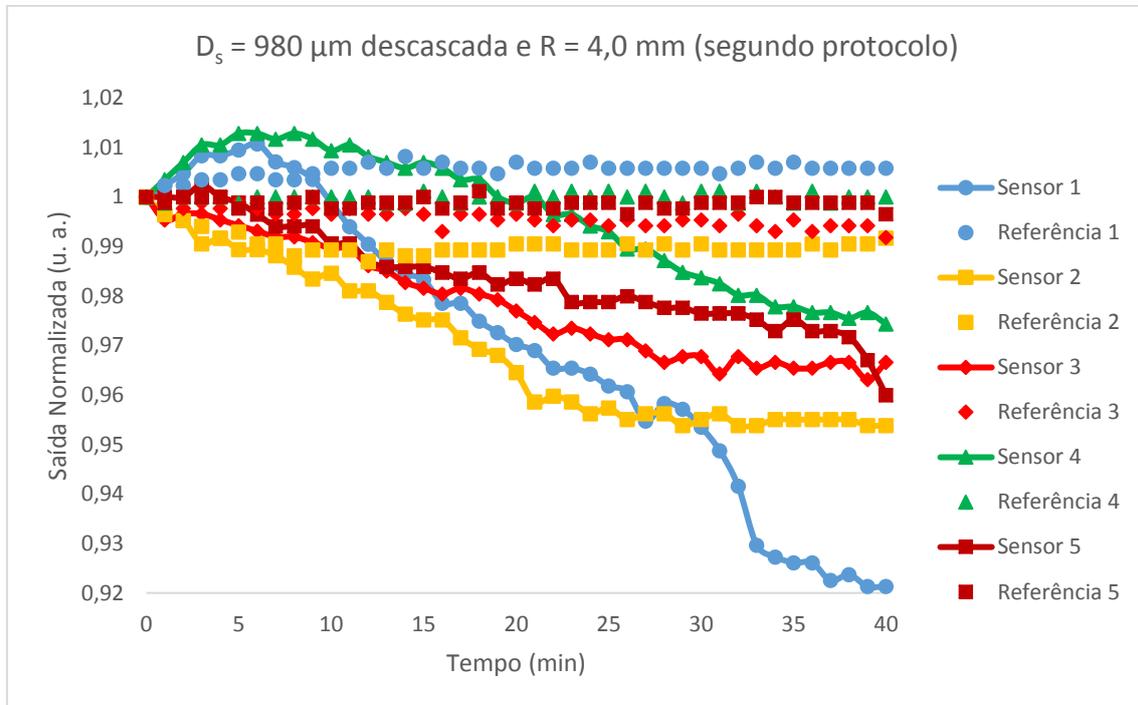


Figura 7.13: Imunossensores funcionalizados com o protocolo biológico 2 para a detecção de *E. coli* em concentração 10⁸ UFC/ml.

Ainda com o objetivo de miniaturizar o imunossensor, um experimento foi realizado com sensores fabricados com a POF de 250 μm de diâmetro e raio de curvatura de 1,5 mm. A sensibilidade deste sensor, de acordo com a simulação, é maior do que a do sensor com fibra de 980 μm descascada e raio de curvatura de 4,0 mm, sendo suas sensibilidades respectivamente, 7,30 e 6,12. A Figura 7.14 apresenta os resultados do experimento.

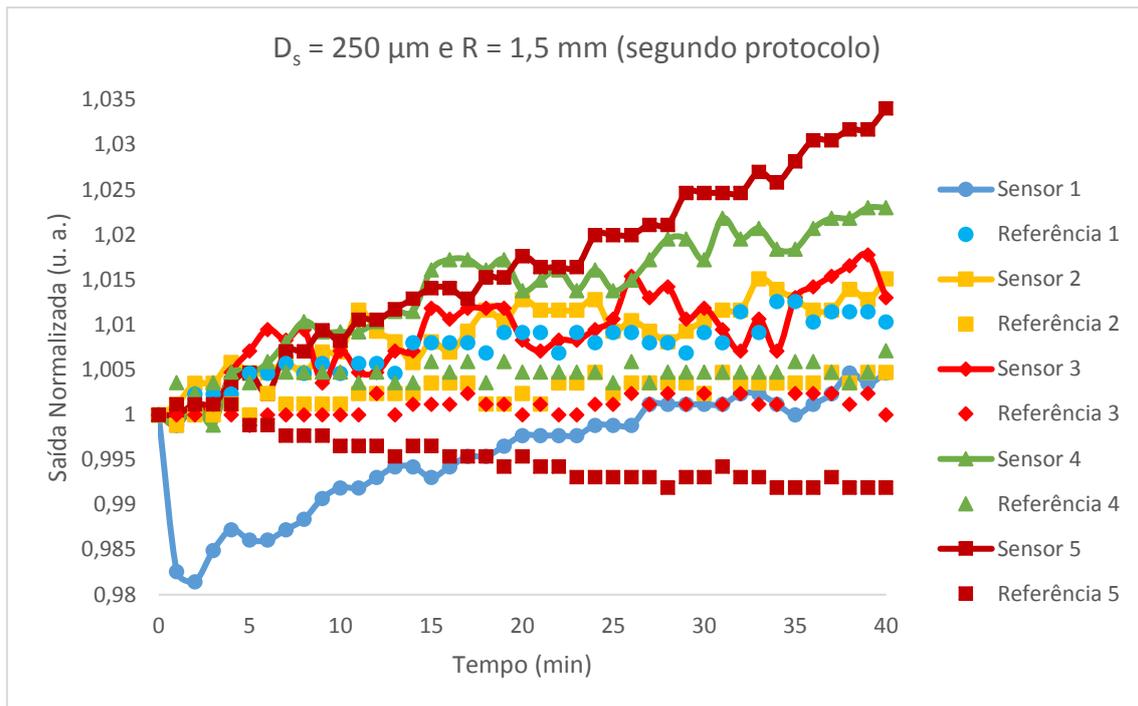


Figura 7.14: Imunossensores confeccionados com fibra de 250 μm descascada e raio de curvatura de 1,5 mm, funcionalizados com o protocolo biológico 2 para a detecção de *E. coli* em concentração 10^8 UFC/ml.

O comportamento apresentado na Figura 7.14 mostra um aumento nas saídas normalizadas dos imunossensores de quase 4 % com a captura de bactérias. Como as características da fibra de 250 μm adquirida não são conhecidas, sabendo-se apenas que possui PMMA, é possível que diferentes tipos de compostos químicos na superfície da fibra tenham favorecido o comportamento apresentado. A análise espectroscópica desta POF, apresentada na Seção 7.1.3, revelou a presença de PVDF.

7.3 Comparação entre os resultados experimentais e as simulações do imunossensor

Os experimentos realizados com o imunossensor não demonstraram repetibilidade para o estabelecimento de parâmetros médios. Desta forma, para comparação entre os resultados encontrados no experimento com imunossensor para a fibra POF de 980 μm e a sua respectiva simulação, considerou-se o sensor 3 da Figura 7.13 como um resultado experimental intermediário após a implementação do protocolo 2, sendo então seu comportamento comparado com os resultados da simulação. Este sensor, agora em destaque na Figura 7.15 apresentou um valor mínimo na saída normalizada de 0,963 em 40 minutos.

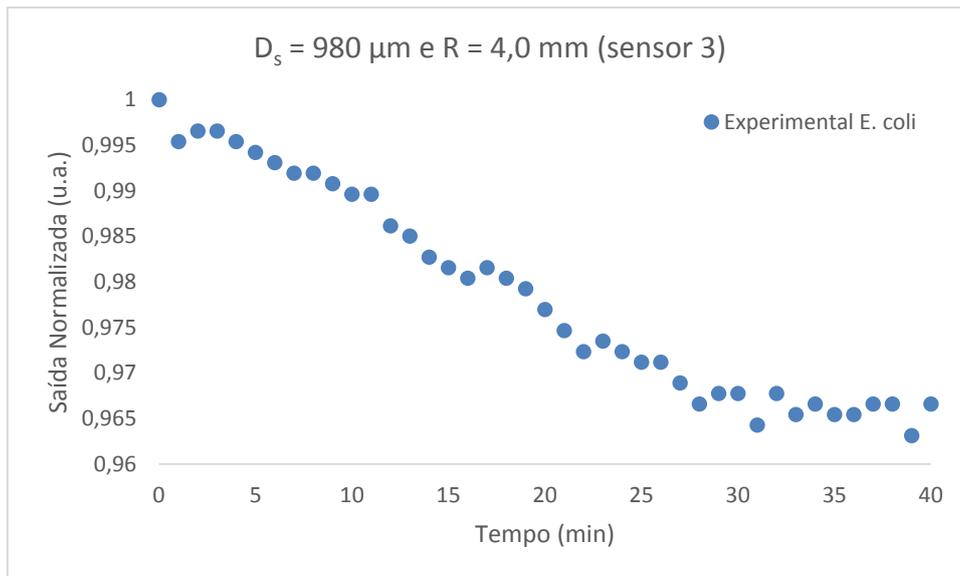


Figura 7.15: Resultado experimental do imunossensor 3 feito com POF de 980 μm de diâmetro e funcionalizado com o protocolo biológico 2.

Durante a primeira modelagem do imunossensor foram estipulados espessuras e índices de refração para a camada de bactérias que envolve o imunossensor após o tempo de captura. Entretanto esta camada não pode ser medida experimentalmente para se determinar o valor exato de sua espessura e índice de refração. Isso dificultou a comparação com o sensor experimental. As oscilações apresentadas nesta simulação limitam ainda mais a possibilidade de comparação. Entretanto estas simulações iniciais foram importantes para observação do fenômeno de interferência que pode ocorrer após o acúmulo de bactérias na fibra.

Já a segunda proposta de modelagem associa a potência de saída com a densidade linear de bactérias sobre a POF. Desta forma é possível associar a potência de saída proporcional à densidade linear de bactérias com a saída real encontrada para o imunossensor experimental. Observando-se a Figura 7.15 com o resultado experimental do sensor 3, pode-se perceber que o limite da saída normalizada ficou próximo ao valor encontrado para a densidade linear simulada de 5 %, cuja potência de saída normalizada foi 0,9687. Desta forma foram realizadas simulações com variação da densidade linear entre 0 e 5 %, com intervalos de 1 %, ampliando o número de pontos para comparação. A Figura 7.16 apresenta os resultados para a simulação também com estes pontos.

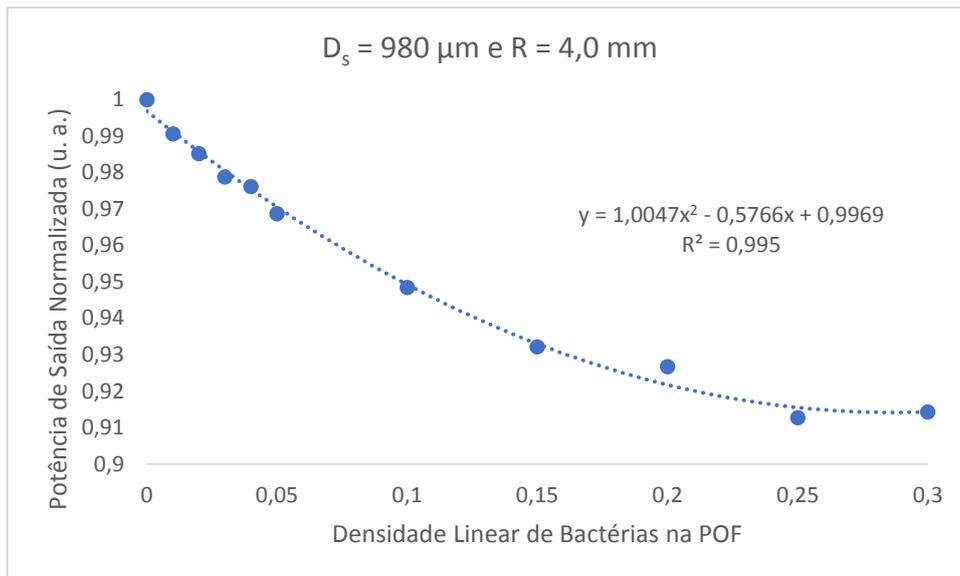


Figura 7.16: Potência de Saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias de 0,01 entre os valores de 0 a 0,05, e com variação de 0,05 entre os valores de 0,05 a 0,30, distribuídos aleatoriamente sobre o sensor U com POF de 980 μm.

A comparação entre os resultados experimental e simulado podem ser vistos na Figura 7.17. Comparando-se os eixos horizontais de tempo e densidade linear de bactérias, estima-se que em 40 minutos a densidade de bactérias sobre o imunossensor 3 era de aproximadamente 5 %, pois a saída normalizada apresentada para os resultados experimental e simulado são compatíveis.

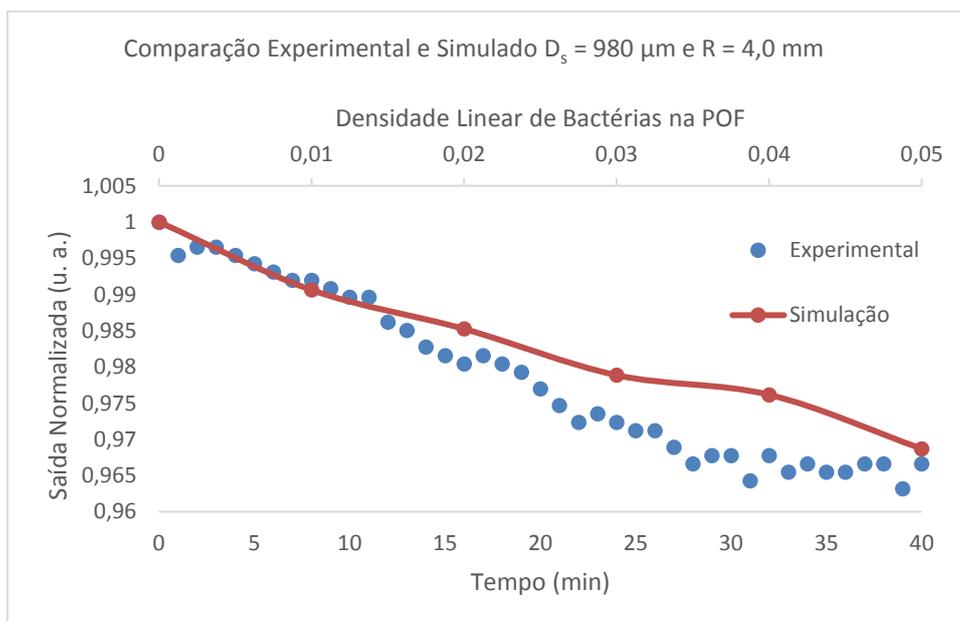


Figura 7.17: Comparação entre os resultados experimentais do sensor 3 feito com POF de 980 μm e da simulação do sensor U com o mesmo diâmetro e raio de curvatura da POF.

Obviamente que as diferenças entre as sensibilidades experimental e simulada encontradas para os sensores no processo de calibração precisam ser consideradas. Conforme a Tabela 6.7 as sensibilidades encontradas foram de 8,17 e 6,12, respectivamente para os sensores experimentados e simulados. Desta forma, como a sensibilidade do sensor simulado é menor, é provável que a quantidade de bactérias sobre o imunossensor experimental seja ainda menor do que 5 %. Isto é compatível com as imagens mostradas pelo MEV na Figura 7.3.

Capítulo 8

Modelagem de diferentes formas do sensor

Estudos apresentados na fundamentação teórica do sensor óptico, demonstram que várias curvas foram feitas na fibra de sílica para o aumento da sensibilidade [53]. Com esse mesmo objetivo, foram realizadas simulações para verificação dos modelos Espiral e Zigue-zague nas fibras com as características e dimensões da POF.

O modelo Espiral é um prolongamento do sensor U, possuindo curvas sempre para o mesmo lado, sendo assim formado através da modelagem de uma volta completa e mais meia volta, para que a entrada e a saída da POF fiquem na mesma direção e sentido. Já no modelo Zigue-zague as curvas são alternadas. A Figura 8.1 mostra as formas geométricas adotadas.

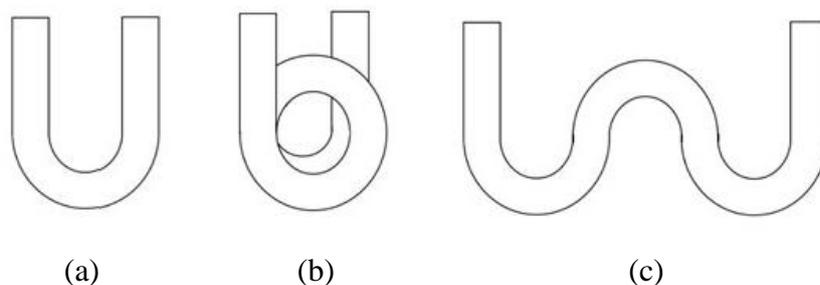


Figura 8.1: Modelos dos sensores: (a) U (b) Espiral (c) Zigue-zague implementados para simulação

No processo computacional, o sensor Espiral é implementado aumentando-se o raio da curva de 180° no sensor U para 540° . No modelo Zigue-zague, as curvas de 180° são alternadas com raios positivo e negativo em sequência. A Figura 8.2 apresenta a interface de programação do BeamPROP™ com o modelo Zigue-zague, onde o retângulo amarelo intermediário possui raio negativo para modelar a curva invertida. O mesmo procedimento foi adotado para a representação das bactérias nesta região.

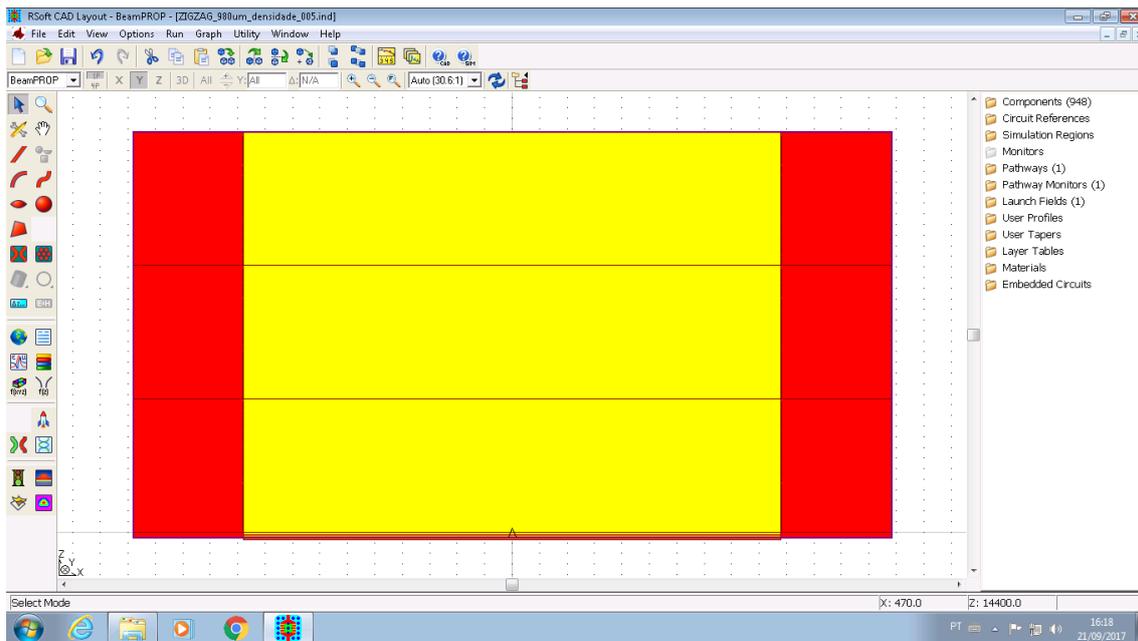


Figura 8.2: Interface de programação do BeamPROP™ preparada para simulação do Sensor Zigue-zague. Em amarelo a POF e em vermelho o meio externo. A faixa amarela central foi configurada com raio de curvatura negativo.

Inicialmente, foram realizadas simulações com as características da POF de 980 μm de espessura, com raio de curvatura de 4,0 mm. A Figura 8.3 apresenta os resultados encontrados para o processo de medida de índice de refração com os Sensores U, Espiral e Zigue-zague. O Sensor Espiral apresenta a mesma sensibilidade do sensor U, com uma atenuação de aproximadamente 40 %. O sensor Zigue-zague apresenta uma sensibilidade bem maior, alcançando uma atenuação de quase 70 % para o valor de índice de refração correspondente de 1,39.

O imunossensor foi simulado também para os modelos Espiral e Zigue-zague para comparação com os resultados anteriores do imunossensor em forma de U. A Figura 8.4 apresenta os resultados da simulação do imunossensor Espiral e a Figura 8.5 mostra os resultados do imunossensor Zigue-zague, considerando-se em ambos uma cobertura de bactérias com espessura variável entre 0,5 μm e 2,0 μm .

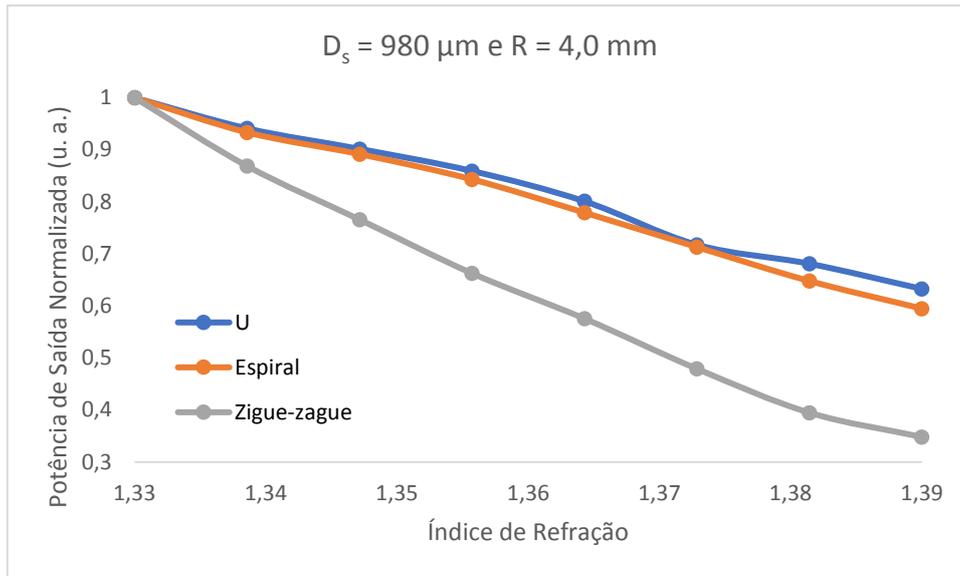


Figura 8.3: Resultados da simulação do processo de calibração do sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de $980 \mu\text{m}$.

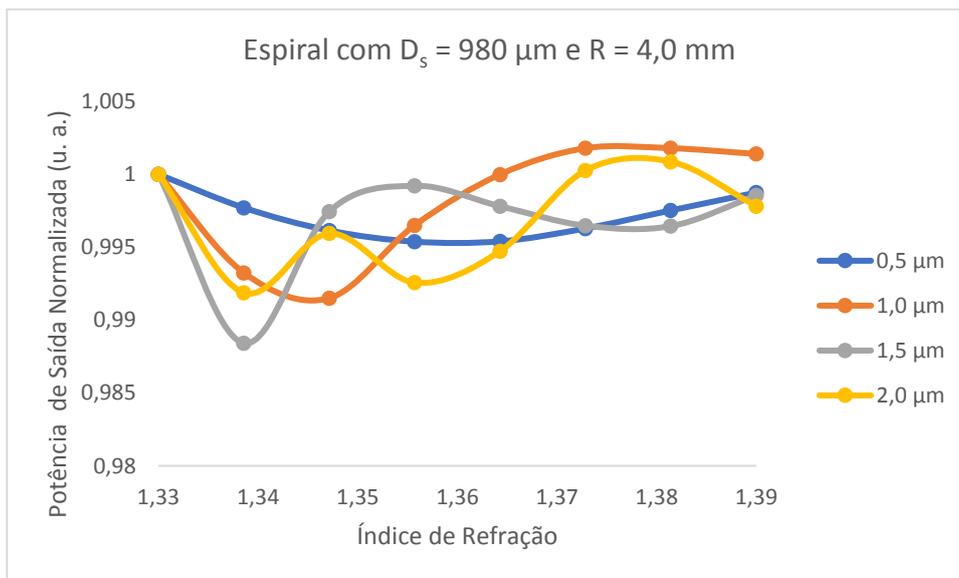


Figura 8.4: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Espiral com POF de $980 \mu\text{m}$.

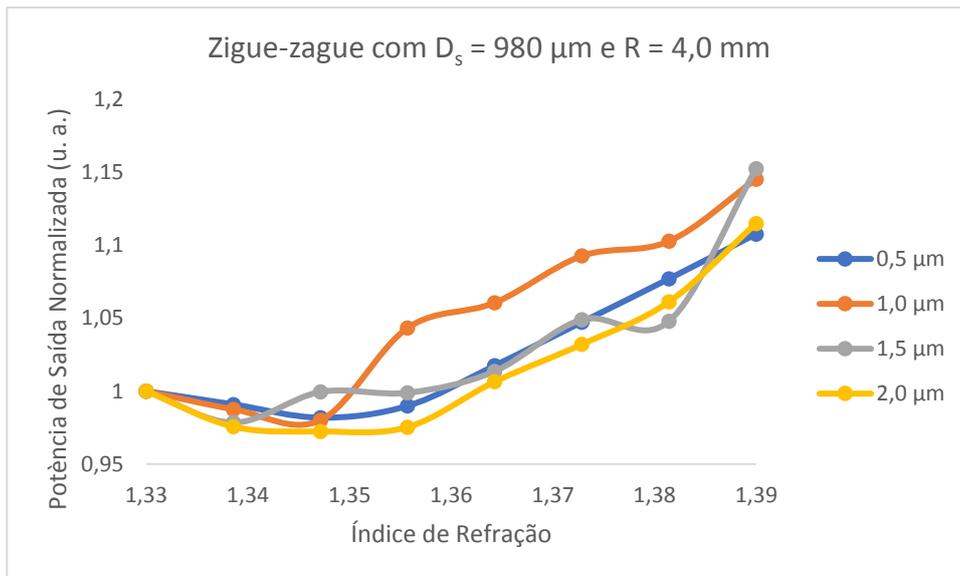


Figura 8.5: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Zigue-zague com POF de 980 μm .

Observa-se que as oscilações aparecem tanto no imunossensor Espiral quanto no Zigue-zague, o que dificulta a utilização do modelo, conforme discutido no imunossensor em forma de U. Confirma-se assim que esta modelagem não deve ser utilizada, pois não permite comparação com resultados experimentais.

Tendo em vista as mesmas dificuldades encontradas na simulação das bactérias no imunossensor U com a faixa contínua de índice de refração variável, foi também realizada a simulação do imunossensor através da variação da densidade linear de bactérias sobre a POF. A Figura 8.6 apresenta os resultados encontrados, onde o imunossensor Zigue-zague apresenta inicialmente uma estabilidade dos resultados para uma atenuação de 20 % e próximo de 13 % de densidade linear sua sensibilidade foi superada pelo sensor Espiral, que chega a 30 % de atenuação. Nesta atenuação 30 % do sensor está coberto por bactérias.

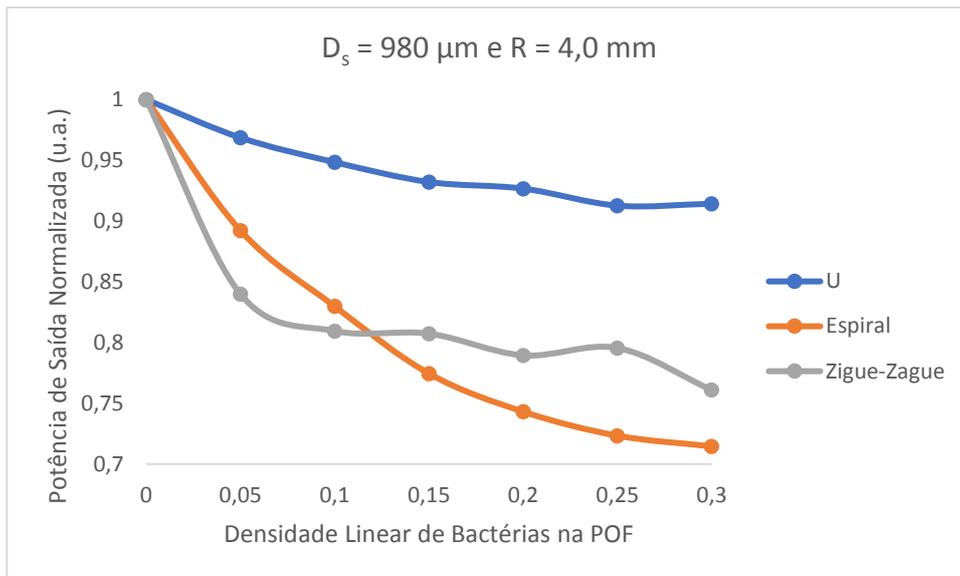


Figura 8.6: Simulação do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de $1,0 \times 2,0 \mu\text{m}$ e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de $980 \mu\text{m}$.

Como a POF de $250 \mu\text{m}$ com raio de curvatura de $1,5 \text{ mm}$ apresentou na simulação uma sensibilidade melhor do que o sensor POF de $980 \mu\text{m}$ com raio de $4,0 \text{ mm}$, foram realizadas simulações dos sensores Espiral e Zigue-zague também para este modelo de fibra. A Figura 8.7 apresenta os resultados da simulação do processo de medida de índice de refração. Observa-se que no Sensor Espiral a curva é similar ao Sensor U, com atenuação da potência de saída normalizada de aproximadamente 40 %. Entretanto o Sensor Zigue-zague apresenta-se muito mais sensível, com uma atenuação da potência de 90 % para a variação do índice de refração entre 1,33 e 1,39.

Foram também modelados os imunossensores Espiral e Zigue-zague com espessura de bactéria entre $0,5 \mu\text{m}$ e $2,0 \mu\text{m}$. Os resultados são apresentados na Figura 8.8 e na Figura 8.9 respectivamente para os imunossensores Espiral e Zigue-zague. Para os imunossensores Espiral as atenuações foram próximas de 5 %. Já o imunossensor Zigue-zague tem um melhor resultado, alcançando uma atenuação na potência de saída normalizada de quase 25 % para a espessura de $2,0 \mu\text{m}$. Neste caso o índices de refração de aproximadamente 1,365, começando então a oscilar.

Importante lembrar que a partir do instante em que os sensores apresentam oscilações na potência de saída os índices de refração subsequentes não podem ser avaliados, pois apresentam duplicidade de valores de índices de refração com a mesma potência. Assim, estes resultados confirmam a ineficiência do método utilizado na simulação. Todos os sensores Zigue-zague implementados, tanto na POF de $980 \mu\text{m}$

quando na POF de 250 μm apresentam atenuações superiores ao sensor U sem oscilações até o índice de refração de 1,34.

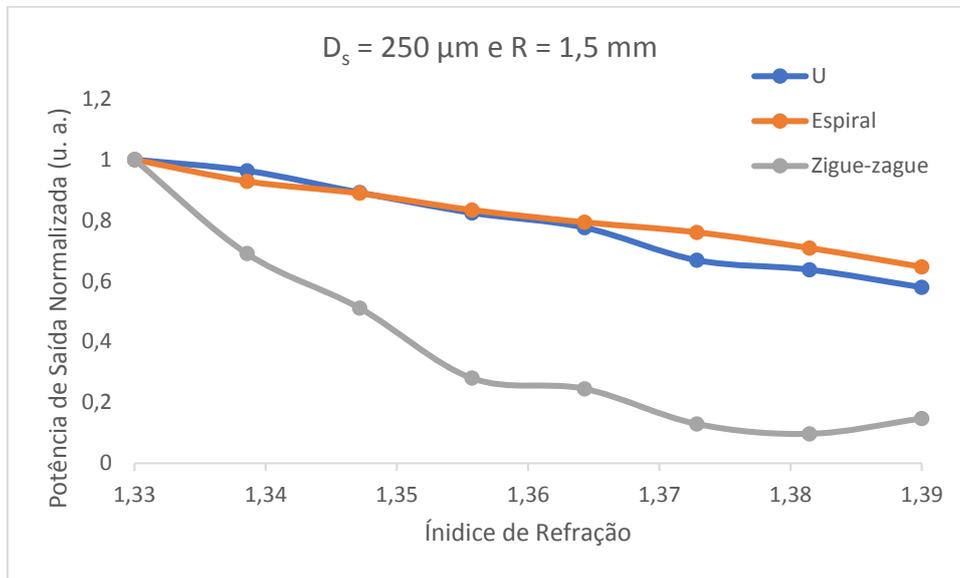


Figura 8.7: Resultados da simulação do processo de calibração do sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de 250 μm .

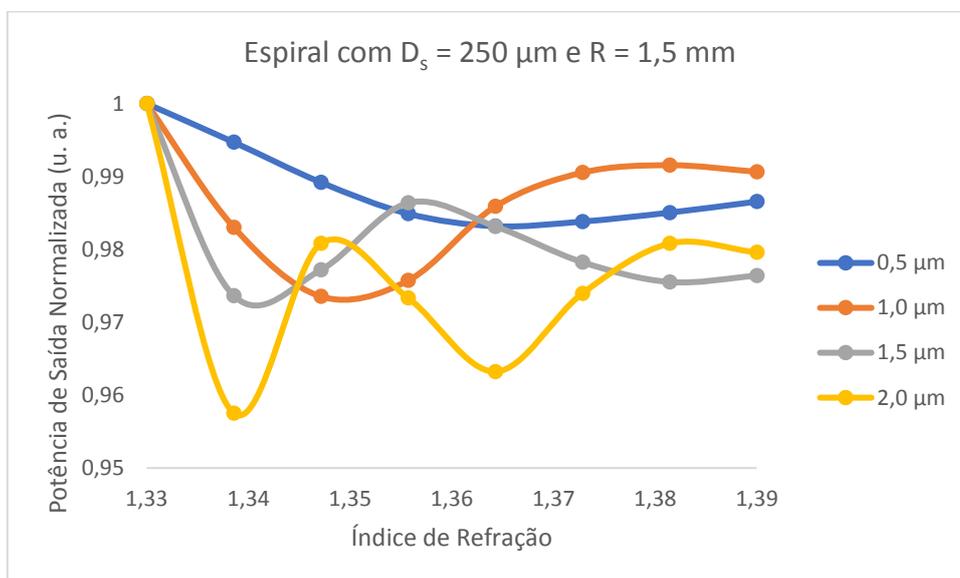


Figura 8.8: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Espiral com POF de 250 μm .

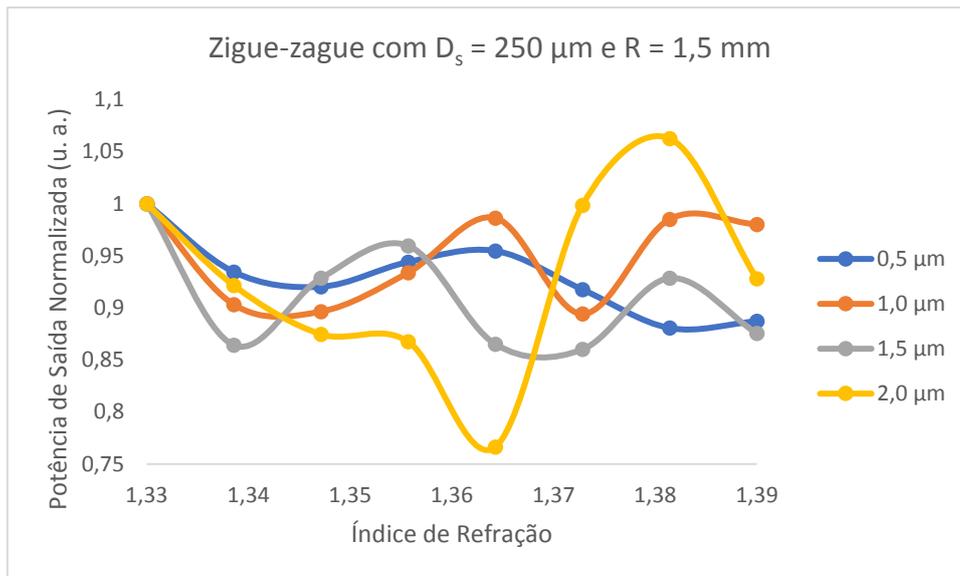


Figura 8.9: Simulação da presença de bactérias com a variação do índice de refração de uma camada variável na superfície do Sensor Zigue-zague com POF de 250 μm .

A variação da densidade linear das bactérias sobre o sensor foi também simulada para a POF de 250 μm de diâmetro. Esta simulação permite uma futura comparação com resultados experimentais. Os resultados apresentados na Figura 8.10 mostram que o imunossensor Espiral apresenta uma atenuação de 35 %, enquanto o imunossensor Zigue-zague alcança uma atenuação de 50 %. Este é o melhor resultado encontrado para os imunossensores.

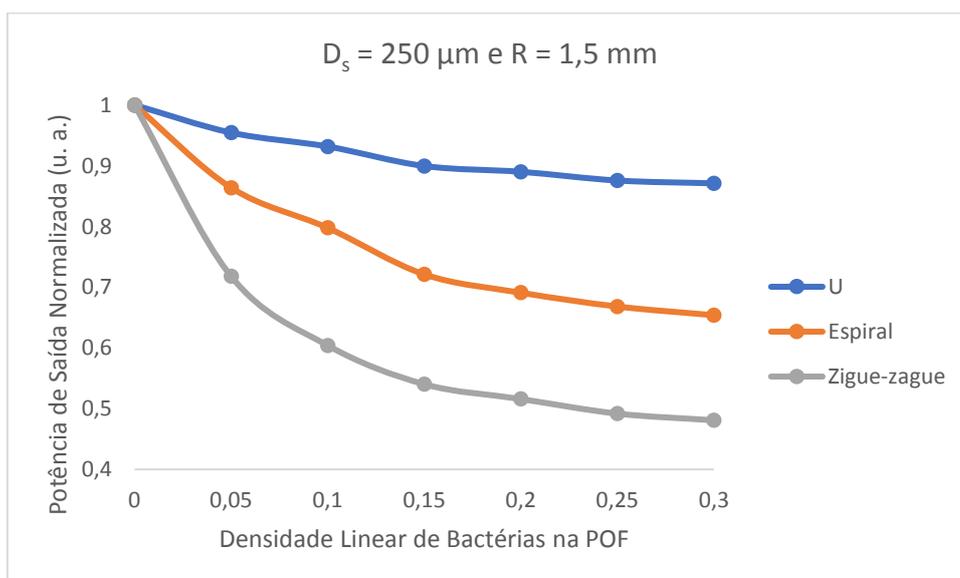


Figura 8.10: Potência de Saída do imunossensor com a variação da densidade linear de bactérias, com dimensões de 1,0 x 2,0 μm e índice de refração fixo em 1,39, distribuídas aleatoriamente sobre o sensor U, Espiral e Zigue-zague com POF de 250 μm .

Para uma melhor visualização dos resultados apresentados neste capítulo, a Tabela 8.1 apresenta os resultados das atenuações percentuais para os sensores U, Espiral e Zigue-zague fabricados tanto com a POF de 980 μm quando com a POF de 250 μm . Foram assim resumidos os resultados do processo de medida de índice de refração dos sensores, os imunossensores com o modelo de variação do índice de refração para a espessura de 1,0 μm e os resultados para a variação da densidade linear da camada de bactérias sobre a POF. Observa-se que o sensor em Zigue-zague com a POF de 250 μm apresenta o melhor resultado, sendo assim importante considerar a possibilidade de sua implementação em trabalhos futuros.

Tabela 8.1: Atenuações percentuais na saída normalizada dos sensores com POF de 980 μm e 250 μm

	Atenuação (%)					
	POF 980 μm			POF 250 μm		
	U	Espiral	Zigue-Zague	U	Espiral	Zigue-Zague
Calibração	37	41	65	41	35	90
Índice variável	2	1	3	4	3	11
Densidade linear	9	29	24	13	35	52

A realização dos experimentos com sensores Zigue-zague está condicionada a melhoria do sistema eletrônico para detecção das baixas potências na saída do sensor. A potência luminosa real na saída deste sensor simulado é de aproximadamente 10 % da potência na entrada para o índice de refração de referência da água pura ($n = 1,33$).

Capítulo 9

Conclusões e trabalhos futuros

O trabalho apresentado analisou e implementou um imunossensor a fibra óptica plástica. Um sistema eletrônico foi desenvolvido e a modelagem computacional foi utilizada para a avaliação de novas configurações mais sensíveis, utilizando fibras comercialmente fabricadas. Apresentam-se então as seguintes conclusões:

- O sistema com a plataforma Arduino é eficiente, preciso, prático, inovador e de baixo custo.
- A POF descascada detectou 40 % a mais da presença do anticorpo.
- As melhores sensibilidades encontradas nas simulações de IR foram 7,36 para a POF de 980 μm e 7,30 para a POF de 250 μm .
- Os resultados experimental e simulado de IR foram compatíveis tanto para as fibras de 980 μm quanto para as fibra de 250 μm .
- A comparação do experimento com a modelagem demonstrou que menos de 5 % do imunossensor estava coberto por bactérias.
- O imunossensor Zigue-zague com POF de 250 μm apresentou o melhor resultado, com atenuação de 52 % da potência óptica, sendo esta a maior sensibilidades.

A proposta de um imunossensor em Zigue-zague é inovadora, podendo sua implementação experimental avançar em trabalhos futuros no LIF. A continuidade da pesquisa exige uma eletrônica ainda mais sensível, pois as variações encontradas nos resultados experimentais e simulados apontam para índice de refração do meio externo entre 1,33 e 1,35. As melhorias no controle e eficiência dos processos de funcionalização e imobilização do anticorpo são também indispensáveis para a continuidade do projeto.

O desenvolvimento deste trabalho apresentou diversos questionamentos inerentes a um projeto interdisciplinar. As soluções e implementações apresentadas exigiram conhecimentos integrados da física, da química, da biologia, da eletrônica e da modelagem computacional de formas complementares, tornando a pesquisa inovadora e

desafiadora. Um projeto deste nível só se torna possível com a participação de uma equipe profissional e competente, equipe esta que o Laboratório de Instrumentação e Fotônica vem construindo e aprimorando a cada ano. Os desafios continuam, aguardando novos alunos, professores e demais profissionais interessados e dispostos a investir no desenvolvimento científico e tecnológico.

Capítulo 10

Referências bibliográficas

[1] WERNECK, M. M. *Transdutores e Interfaces*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Ed. LTC, 1996.

[2] WANDERMUR G.L., RODRIGUES D. M. C., ALLIL, R. C. S. B., QUEIROZ V. M., PEIXOTO R., WERNECK M. M., MIGUEL M. “Plastic Optical Fiber-Based Biosensor Platform for Rapid Cell Detection”, *Biosensors & Bioelectronics*, v. 54, p. 661- 666, 2013.

[3] ANDERSON, G. P., JACOBY, M. A., LIGLER, F. S., KING, K. D. “Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor”, *Biosensors & Bioelectronics*; Vol. 12. Vol. 4. Pag. .329-36, 1997.

[4] GOUVEIA, C.A V. J. *Sensores em fibra óptica para monitorização ambiental*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Comunicações e Redes. Departamento de matemática e engenharias Universidade de Madeiras, Portugal, 2008.

[5] ZUBIA, J., GERMÁN G., ARRUE J., “Passive Device Based on Plastic Optical Fibers to Determine the Indices of Refraction of Liquids”, *Applied Optics*, vol. 39, n. 6, pp. 941 – 946, 2000.

[6] BERES, C., NAZARÉ, F. V. B., SOUZA N. C. C., MIGUEL, M. A. L. and WERNECK, M. M., “Tapered Plastic Optical Fiber-Based Biosensor”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 30, pp. 328 – 332, 2011.

[7] FERREIRA, A. P. *Bacteriosensor – Tecnologia de sensoriamento bacteriológico a fibra óptica*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação de Engenharia COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2000.

- [8] BERES C. *Desenvolvimento de metodologia de detecção de microrganismos em água, baseada em biossensor de fibra óptica plástica*. Monografia apresentada para grau de Bacharel da Escola de Nutrição/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009.
- [9] SOUZA, N.C. C., *Desenvolvimento de um imunossensor para detecção de Escherichia coli em água*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2010
- [10] WANDERMUR, G. L. *Imunossensor óptico para detecção rápida de microrganismos em água*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências da Saúde/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2013.
- [11] RODRIGUES, D. M. C., *Desenvolvimento e caracterização de sensores a fibra óptica plástica para refratometria baseados em modulação de amplitude*. Dissertação de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2013.
- [12] LAZCKA, O., CAMPO, F. J. D., MUÑOZ, F.X. "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors", *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 22: 1205-1217, 2007.
- [13] DEISINGH, A. K.; THOMPSON, M. J. "Strategies for the detection of Escherichia coli O157:H7 in foods", *Appl. Microbiol.* 96, 419–429, 2004.
- [14] BLAIS, B.W.; LEGGATE, J.; BOSLEY, J.; MARTINEZ-PEREZ, A. "Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of Escherichia coli O157 by a novel polymyxin-based ELISA", *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 516–522, 2004.
- [15] ASSIS, D. M., JULIANO, L., JULIANO, M. A., 2011. "A espectrometria de massa aplicada na classificação e identificação de micro-organismos", *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 9, n.2, pp. 344–55.

- [16] GENG, T., MORGAN, M.T. & BHUNIA, A.K. “Detection of Low Levels of *Listeria monocytogenes* Cells by Using a Fiber-Optic Immunosensor”, *Applied environm microbiol*, 70 (10): 6138–6146, 2004.
- [17] GARCIA, M.V., MOTTRAM, T. “Biosensor technology addressing agricultural problems”, *Biosystems Engineering*, 84(1): 1-12, 2003.
- [18] GENG, T., UKNALIS, J., SU-I TU & BHUNIA, A. K., “Fiber-Optic Biosensor Employing Alexa-Fluor Conjugated Antibody for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from Ground Beef in Four Hours”, *Sensors* 6, 796-807, 2006.
- [19] LIU, T. ZHAO, Y., ZHANG. Z., ZHANG, P., LI, J., YANG, R., YANG, C. and zhou, L. “A fiber optic biosensor for specific identification of dead *Escherichia coli* O157:H7”, *Sensors and Actuators B*, v. 196, p. 161-167, 2014.
- [20] WUJCIK, E. K., WEI, H., ZHANG, X. GUO, J. YAN, X. SUTRAVE, N. WEI, S. and GUO, Z. “Antibody nanosensors: a detailed review”, *RSC Advances*, v. 4, p. 43725-43745, 2014.
- [21] YILMAZ, E., MAJIDI, D., OZGUR, E. and DENIZLI, A. “Whole cell imprinting based *Escherichia coli* sensors: A study for SPR and QCM”, *Sensors and Actuators B*, v. 209, p. 714-721, 2015.
- [22] MOLLYE SANDERS, YONGBIN LIN, JIANJUN WEI, TAYLOR BONO, ROBERT G. LINDQUIST. “An enhanced LSPR fiber-optic nanoprobe for ultrasensitive detection of protein biomarkers”, *Biosensors & Bioelectronics*, v. 61, p. 95-101, 2014.
- [23] YOO, S. M. KIM, D. and LEE, S. Y. “Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species”, *Talanta*, v. 132, p. 112-117, 2015.

- [24] JIN, Y., WONG, K. H. and GRANVILLE, A. M. “Enhancement of localized surface plasmon resonance polymer based biosensor chips using well-defined glycopolymers for lectin detection”, *Journal of Colloid and interface Science*, v. 462, p. 19-28, 2016.
- [25] JIN, Y., WONG, K. H. and GRANVILLE, A. M. “Developing localized surface plasmon resonance biosensor chips and fiber optics via direct surface modification of PMMA optical waveguides”, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. V. 492, p. 100-109, 2016.
- [26] GOWRI, A., SAI, V.V.R. “Development of LSPR based U-bent plastic optical fiber sensors”, *Sensors and Actuators B: Chemical* v. 230, p. 536–543, 2016.
- [27] ARCAS, A. S. *Nanobiossensor a fibra óptica revestido com filme fino de ouro para detecção da bactéria Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2017.
- [28] KO, S. and GRANT, S. A. “A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of Salmonella typhimurium”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 21, p. 1283-1290, 2006.
- [29] QUEIRÓS, R. B., GOUVEIA, C. FERNANDES, J. R. A. and JORGE, P. A. S. “Evanescent wave DNA-aptamer biosensor based on long period gratings for the specific recognition of E. coli outer membrane proteins”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 62, p. 227-233, 2014.
- [30] AMABIS. J. M., MARTHO. *Biologia dos organismos*. Ed. Moderna, 2ª ed.1(1). 616 p., 2004.
- [31] LUONG J. H. T., MULCHANDANI A., GUILBAULT G. G. “Developments and applications of biosensors”, *Trends in BioTechnology*, 6(12), 310–316, 1988.

- [32] KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A., RAMANAVICIENE, A., KIRLYTE, J., RAMANAVICIUS, A. “Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor”, *Anal. Chem.* 82: 6401–6408, 2010.
- [33] FIXE, F., DUFVA, P., TELLEMAN, M. and CHRISTENSEN, C.B.V. “Functionalization of poly (methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays”, *Nucleic Acids Research*, vol. 32, n. 1, 2004.
- [34] CRIVIANU-GAITA, V., THOMPSON, M. “Immobilization of Fab’ fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications”, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 70, p. 167-180, 2015.
- [35] KUMADA, Y., HAMASAKI, K., NAKAGAWA, A., SASAKI, E., SHIRAI, T., OKUMURA, M., INOUE, M., KISHIMOTO, M., J. “Immobilization and functional reconstitution of antibody Fab fragment by solid-phase refolding”, *Journal of Immunological Methods* 400–401, p. 70–77, 2013.
- [36] TOMA, K., SUZUKI, Y. KISHIKAWA, C., SAITO, M., MIYAJIMA, K., ARAKAWA, T., SHIMOMURA, H. and MITSUBAYASHI, K. “Chemifluorescent optical fiber immunosensor for on-site bioaerosol monitoring system”, *Sensors and Material*, vol. 27, n. 11, p. 1113-1122, 2015.
- [37] MATLOCK-COLANGELO, L. COON, B. PITNER, C. L., FREY, M. W. and BAEUMNER, A. J. “Functionalized electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers for on-chip concentration of E. coli cells”, *Anal Bioanal Chem.* 408:1327-1334, 2016.
- [38] CHO, D., MATLOCK-COLANGELO, L., XIANG, C., ASIELLO, P.J., BAEUMNER, A.J., FREY, M. W. “Electrospun nanofibers for microfluidic analytical systems”, *Polymer*. v. 52, p. 3413–3421, 2011.
- [39] MATLOCK-COLANGELO, L., CHO, D., PITNER, C. L., FREY, M. W., BAEUMNER, A. J. “Functionalized electrospun nanofibers as bioseparators in microfluidic systems”, *Lab on a Chip*, v. 12, p. 1696–1701, 2012.

- [40] KHNOUF, R. KARASNEH, D. and ALBISS, B. A. "Protein immobilization on the surface of polydimethylsiloxane and polymethyl methacrylate microfluidic devices", *Electrophoresis*, vol. 37, p. 529-535, 2016.
- [41] BULMUS, V., AYHAN, H. and PISKIN, E. "Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization". *Chemical Engineering Journal* , v. 65, p. 71-76, 1997.
- [42] KOIKE Y. *Fundamentals of plastic optical fibers*. Wiley-VCH, 2015.
- [43] SNYDER, W. A. and LOVE, J. D., "*Optical Waveguide Theory*", Chapman and Hall, New York, 1983.
- [44] GUPTA, B. D., DODEJA, H. e TOMAR, A. K. "Fibre-optic evanescent field absorption sensor based on a U-shaped probe", *Optical and Quantum Electronics* 28 (1996) 1629-1639.
- [45] GRIFFITHS, D. J. *Introduction to electrodynamics*, 3rd ed, Upper Saddle River, New Jersey, Ed. Prentice Hall, 1999.
- [46] LEUNG, A., SHANKAR, P. M., MUTHARASAN, R., "A review of fiber-optic biosensors", *Sensors and Actuators B*, 125, pp. 688-703, 2007.
- [47] POPE, R. M. and FRY, E. S., "Absorption spectrum (380-700 nm) of pure water. II. Integrating cavity measurements", *Appl. Opt.*, 36, 8710-8723, 1997.
- [48] JING, N., ZHENG, J., ZHAO, X. and TENG, C. "Investigation of a macrobending micro-plastic optical fiber for refractive index sensing", *Applied Optics*, vol. 53, n. 34, 2014.
- [49] JING, N., TENG, C., ZHAO, X. and ZHENG, J. "Temperature dependence of a refractive index sensor based on a macrobending micro-plastic optical fiber", *Applied Optics*, vol. 54, n. 8, 2015.

- [50] JING, N., ZHENG, J., ZHAO, X. and TENG, C. “Refractive Index Sensing Based on a Side-Polished Macrobending Plastic Optical Fiber”, *IEEE Sensor Journal*, vol. 15, n. 5, 2015.
- [51] YAN, H., ZHANG, C., ZHAO, X., ZHEN, Z. LI, Q. and CAO, J. “Experimental study of liquid refractive index sensing based on a U-shaped micro-fiber”. *Optik*, vol.126, p. 1254-1257, 2015.
- [52] TENG, C., JING,N, YU, F. E ZHENG, J. “Investigation of a Macro-Bending Tapered Plastic Optical Fiber for Refractive Index Sensing”, *IEEE Sensors Journal*, v. 16, n.. 20, 2016.
- [53] FABIAN, M., LEWIS, E., NEWE, T., LOCHMANN, S. AND MUELLER, I. “Investigation of Ethanol And Methanol Water Mixtures in the Visible Wavelength Area Using Fibre-Optic Evanescent Field Absorption Sensors Based on a U-Shaped, a Coil-Shaped and a Meander-Shaped Probe”, *SAS 2008 – IEEE Sensors Applications Symposium Atlanta, GA*, 2008.
- [54] MICHAEL J., PELCZAR JR., E.C.S.CHAN, NOEL R. KRIEG. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Pearson Makron Books, v. 1, ed. 2, 1997.
- [55] MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G. e AMENDOEIRA, M. R. R. “Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde”, *EPSJV; IOC*, v. 4, 2009.
- [56] MERCHANT, D.F., SCULLY, P.J. and SCHMITT, N.F. “Chemical tapering of polymer optical fibre”, *Sensors and Actuators* , 76, p. 365–371, 1999.
- [57] SIEMENS, LED SFH485P datasheet. Disponível em <<http://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/view/45673/SIEMENS/SFH485P>. html>. Acesso em abril de 2016.
- [58] SIEMENS, Fotodiodo SFH203P datasheet. Disponível em <<http://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/view/45613/SIEMENS/SFH203P>. html>. Acesso em abril de 2016.

[59] ADVANTECH, PCI-1711 datasheet. Disponível em <<http://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/view/327126/ADVANTECH/PCI-1711.html>>. Acessado em abril de 2016.

[60] GUM – Evaluation of Measurement Data (2008) – www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html

[61] PAVANI, S. R. P. “Optical waveguide analysis using Beam Propagation Method”. *Micro-Optical Imaging Systems Laboratory*. University of Colorado at Boulder. 2006. Disponível em <http://www.prashub.com/prasanna/files/waveguide_beamprop.pdf> Acessado em março de 2017.

[62] MARTINS, A., ROCHA, A. M., NETO, B., TEIXEIRA, A. L. J., FACÃO, M., NOGUEIRA, R. N., LIMA, M. J. and ANDRE, P.S. “Modeling of Bend Losses in Single-Mode Optical Fibers”, *Proceeding of 7th Conference on Telecommunications – Conftele*, 2009.

Anexo A

Programa da plataforma Arduino

/*

Leitor de Índice de Refração

Esse programa mede variações do índice de refração na água.
Nesse sistema são analisados dois sensores, 1º como sistema sensor
e 2º como referência.

Autor: Fernando L. Maciel

Data: 19/08/2015

Versão: 7.0

*/

```
boolean Debug = false; // valor inicial do modo Debug
int pino1_PWM = 3; // saída de tensão do LED1
int pino2_PWM = 5; // saída de tensão do LED2
int Vad; // variável não usada
int v_PWM_1 = 80; // valor inicial de configuração do PWM do LED 1, controlando
sua tensão
int v_PWM_2 = 80; // valor inicial de configuração do PWM do LED 2, controlando
sua tensão.
int tempoMedidas = 3; // intervalo de tempo entre as medidas efetuadas pelo programa
float ResistorEmissor = 47.0; // valor do resistor
float v_Arduino = 4.765; // valor da tensão máxima na saída de pino do Arduino
float f_Conv_V = v_Arduino/1023.0; // fator de conversão em tensão da entrada
analógica do Arduino
float f_Conv_ImA = (f_Conv_V*1000.0)/ResistorEmissor; // fator de conversão em
corrente da entrada analógica do Arduino

int Sensor_1; // Entrada analógica do Sensor 1
int Sensor_2; // Entrada analógica do Sensor 2
int V_Ref_Led_1 = A0; // Entrada
analógica retorno do driver de corrente LED 1
int Corrente_1; // valor da corrente medida no LED 1
int Corrente_2; // valor da corrente medida no LED 2
int pino_Led_1 = A0; // Entrada analógica retorno do driver de corrente LED 2
int pino_Led_2 = A1; // Entrada analógica retorno do driver de corrente LED 2
int pino_Sensor_1 = A2;
int pino_Sensor_2 = A3;

char op; // guarda a ultima tecla pressionada pelo usuário

//Função para calibrar o sistema
void CalibrarSistema(){
    float tensao_Ref = 4.0; // Tensão de referencia de saida em Volts.
```

```

int v_Saida_Ref = tensao_Ref*1023/v_Arduino; // Valor de referência para
calibração.
unsigned int linhas=40; // numero máximo de linhas até exibição de um novo
cabeçalho que identifica as variáveis calibradas
unsigned int i; // armazena a quantidade de linhas já escritas (quantidade de
calibrações)
int contEst=0; // acumula a quantidade de ciclos estáveis após efetuada uma calibração
unsigned int n = 0;
int erroCal=5; // variável que guarda o valor do erro máximo entre a tensão de entrada
dos Sensores e a tensão de Referência
boolean sair=false;
int difSensor1 = 0;
int difSensor2 = 0;

/* o numero de linhas atual eh definido como o numero máximo para uma primeira
exibição do cabeçalho */
i=linhas;

//while ((op!='P') && (op!='p')){

    /* Loop que verifica duas variáveis: sair, contEst.
    * Esse loop analisa a estabilidade da calibração dos sensores, se houver grande
    variação nas entradas dos sensores, uma nova calibração ''e feita.
    * Variável "sair" é usada para uma interrupção da calibração pelo usuário,
    pressionando a tecla p/P.
    * Variável "contEst" acumula a quantidade de vezes (ciclos) que as entradas dos
    sensores (tensões) permaneceram dentro da faixa de erro determinada;
    * Se alguma dessas entradas variar mais que o erro permitido, uma rotina de
    calibração é executada e a variável zerada.
    */
    while (!sair && (contEst<10)){

        /* leitura das entradas dos sensores */
        Sensor_1 = analogRead(pino_Sensor_1);
        Sensor_2 = analogRead(pino_Sensor_2);
        Corrente_1 = analogRead(pino_Led_1);
        Corrente_2 = analogRead(pino_Led_2);

        /* Loop que verifica três variáveis: sair, Sensor_1, Sensor_2
        * Variável "sair" é usada para uma interrupção da calibração pelo usuário,
        pressionando a tecla p/P
        * se a variável for "falsa", a rotina de calibração é iniciada
        * Variáveis Sensor_1, Sensor_2 são as tensões nos sensores 1 e 2. O erro em
        relação ao valor de tensão de referencia é calculado separadamente;
        * é feito o módulo de (Sensor_i - tensão de referencia), apos é verificado se
        essa diferença é maior que o erro estabelecido pelo usuário;
        * se algum dos sensores estiver com um erro maior que o estabelecido, é
        iniciada então a rotina de calibração dos sensores.
        * O loop é repetido ate que as entradas dos 2 sensores estejam dentro da faixa
        de erro estabelecida ou ate interrupção do usuário

```

```

*/

difSensor1 = Sensor_1 - v_Saida_Ref;
difSensor2 = Sensor_2 - v_Saida_Ref;
while (!sair && ((abs(difSensor1)>erroCal) || (abs(difSensor2)>erroCal)))
//while (!sair && ((abs(Sensor_1 - v_Saida_Ref)>erroCal)))
{
//while ((Sensor_1 != v_Saida_Ref) || (Sensor_2 != v_Saida_Ref)){

    /* variável "contEst" é reinicializada, pois será feita uma nova calibração para
posterior verificação de estabilidade*/
    contEst=0;

    /* variável "i" é verificada com o numero máximo de linhas para exibição dos
dados de calibração
    * se "i" for igual a esse numero, então um novo cabeçalho é criado para
auxiliar a leitura dos dados
    */
    if(i==linhas){
        i=0;
        if (!Debug)
        {

Serial.println("Pwm_1\tI1_mA\tS_1\tPwm_2\tI2_mA\tS_2\tDiffSe1\tDiffSe2");
        //Serial.println("Pwm_2\tI2_mA\tS_2");
        }
    }

    /* Incremento da variável "i", acumulando a nova linha de dados que será
escrita*/
    i++;

    /* Se o modo Debug estiver ativado, essa pequena rotina será executada
    * Serão escritos na tela as saídas das tensões nos LEDs, as correntes nos
LEDs e as tensões de entrada dos Sensores.
    */
    if (!Debug){
        Serial.print(v_PWM_1*0.392,0);
        Serial.print("%\t");
        Serial.print(Corrente_1*f_Conv_ImA);
        Serial.print("\t");
        ////Serial.print(Sensor_1*f_Conv_V);
        Serial.print(Sensor_1);
        Serial.print("\t");
        Serial.print(v_PWM_2*0.392,0);
        Serial.print("%\t");
        Serial.print(Corrente_2*f_Conv_ImA);
        Serial.print("\t");
        ////Serial.println(Sensor_2*f_Conv_V);
        Serial.print(Sensor_2);

```

```

Serial.print("\t");
Serial.print(difSensor1);
Serial.print("\t");
Serial.println(difSensor2);
}

/* Sequência de 4 comparações para ajuste das tensões nos sensores 1 e 2
* A tensão de entrada de cada sensor é comparada individualmente com o
valor de tensão de referencia;
* Se a entrada for maior, a tensão no respectivo LED é diminuída;
* Se a entrada for menor, a tensão no respectivo LED é aumentada;
* Se a tensão em algum LED chegar em algum valor limite, máximo ou
mínimo, seu valor assim permanecerá.
*/
if (Sensor_1 > v_Saida_Ref){
    v_PWM_1--;
    if (v_PWM_1<0) v_PWM_1=0;
}
if (Sensor_1 < v_Saida_Ref){
    v_PWM_1++;
    if (v_PWM_1>255) v_PWM_1=255;
}
if (Sensor_2 > v_Saida_Ref){
    v_PWM_2--;
    if (v_PWM_2<0) v_PWM_2=0;
}
if (Sensor_2 < v_Saida_Ref){
    v_PWM_2++;
    if (v_PWM_2>255) v_PWM_2=255;
}

/* Alteração das tensões nos LEDs */
analogWrite(pino1_PWM, v_PWM_1);
analogWrite(pino2_PWM, v_PWM_2);
delay(2000);

/* Medição das correntes nos LEDs e das tensões nos Sensores*/
Sensor_1 = analogRead(pino_Sensor_1);
Sensor_2 = analogRead(pino_Sensor_2);
Corrente_1 = analogRead(pino_Led_1);
Corrente_2 = analogRead(pino_Led_2);

if (!Debug) Serial.println("0% calibrado.");

/* Leitura da porta serial que conecta o PC com o Arduino para verificar se o
usuário deseja interromper a calibração
* Se houver bytes a serem lidos, a leitura é feita;
* Se a tecla pressionada for "p" ou "P" (minúsculo ou maiúsculo), a variável
"sair" é alterada para "verdadeira";

```

* Com isso, as condições de saída dos loops internos serão satisfeitas e a calibração será interrompida.

```
*/
if (Serial.available() > 0) {
  op = Serial.read();
  if ((op='P') || (op='p')) sair=true;
}
}

/* Ao termino da rotina de calibração dos sensores, a variável "contEst" é
incrementada;
* Assim, é registrada a primeira vez que os sensores estão calibrados.
* Caso os sensores continuem calibrados no ciclo seguinte, a rotina de
calibração não é executada e "contEst" incrementada;
* Assim, acumula-se a quantidade de ciclos seguidos que os sensores estão
calibrados;
* Ao completar 10 ciclos seguidos de estabilidade na calibração, o loop de
verificação de estabilidade é interrompido.
*/
contEst++;

/* Verifica o da variável "sair" para decidir qual mensagem informativa enviar
ao usuário;
* Se "sair" for "falsa", é exibido o ciclo atual de estabilidade da calibração;
* Se "sair" for "verdadeira", é exibido um alerta indicando a interrupção da
calibração.
*/
if (!sair){
  /* Mensagem que indica em porcentagem a quantidade de ciclos estáveis da
calibração*/
  Serial.print(contEst*10);
  Serial.println("% calibrado.");
}

/* Mensagem que indica a interrupção pelo usuário da calibração */
else Serial.println("Calibracao interrompida.");
delay(500);
}
//}

/* Caso a calibração seja efetuada, sem interrupção pelo usuário, é exibida uma
mensagem informando a conclusão da calibração */
Serial.println();
if (!sair) Serial.println("Sistema Calibrado, pronto para realizar medidas.");
} /*Fim da função Calibrar*/
```

/* Função que efetua as medidas de tensões nos Sensores, de tensões e correntes nos LEDs e exibe seus valores

* Função usada durante os testes com as fibras óticas

```

*/
void Medir(){

/* variável para contagem no loop: i
* variável para exibição da medida realizada: m
*/
int i,m = 0;

/* Escrita na tela do PC de um cabeçalho identificando a origem de cada medida
realizada */
Serial.println("\n\tI1\tI2\tSen_1\tSen_2\tDiferenca(Sen_1 - Sen_2)");
//Serial.println("\n\tI1\tSen_1\t");

/* Loop que efetua as medidas
* Sua interrupção é feita somente pelo usuário ao pressionar a tecla p/P
*/
while ((op!='P') && (op!='p')){
    int i; // intervalo de tempo atualmente decorrido, para comparação com o intervalo
de tempo desejado entre medições
    //delay(tempoMedidas);
    //Serial.println("K");

    /* Loop que realiza:
    * 1) a contagem do intervalo de tempo entre as medições
    * A variável global "tempoMedidas" guarda o valor do intervalo de tempo entre
as medições;
    * A variável "i" guarda o intervalo de tempo já decorrido, sendo incrementada
apos cada ciclo;
    * Quando "i" for igual a "tempoMedidas", significa que o intervalo de tempo
desejado foi atingido;
    * A saída do loop é efetuada e uma nova medição será então realizada.
    * 2) a leitura da tecla pressionada pelo usuário
    * Se houver bytes a serem lidos no buffer da porta serial entre o Arduino e o PC,
a variável "op" eh atualizada
    * com o valor atual da tecla pressionada pelo usuário;
    * Se a tecla "p" ou "P" for pressionada, "i" eh imediatamente atualizada para o
valor do intervalo de tempo de medida desejada;
    * Assim, uma ultima leitura será realizada com posterior saída do loop principal.
    * Se não houver nenhum byte a ser lido (sem envio de dados para o PC), a
contagem do intervalo de tempo eh feita normalmente.
*/

/* Leitura das tensões de entrada dos Sensores e das correntes nos LEDs */
Sensor_1 = analogRead(pino_Sensor_1);
Sensor_2 = analogRead(pino_Sensor_2);
Corrente_1 = analogRead(pino_Led_1);
Corrente_2 = analogRead(pino_Led_2);

/* Escrita na tela do PC dos valores medidos, realizando as devidas conversões de
valores */

```

```

Serial.print(m++);
Serial.print("\t");
Serial.print(Corrente_1*f_Conv_ImA);
Serial.print("\t");
Serial.print(Corrente_2*f_Conv_ImA);
Serial.print("\t");
Serial.print(Sensor_1*f_Conv_V,4);
Serial.print("\t");
Serial.print(Sensor_2*f_Conv_V,4);
Serial.print("\t");
Serial.println((Sensor_1-Sensor_2)*f_Conv_V,4);

/* Se o modo Debug estiver ativado, eh exibida também as tensões dos sensores sem
conversão */
if (Debug){
  Serial.print(Sensor_1);
  Serial.print("\t");
  Serial.println(Sensor_2);
}

for (i=0;i<tempoMedidas;i++){
  delay(1000);
  if (Serial.available() > 0) {
    op = Serial.read(); /* Leitura serial da tecla pressionada pelo usuario */
    //Serial.println(op);
    if ((op=='p') || (op=='P')) i=tempoMedidas;
  }
  //Serial.print((i+1)*2);
  //Serial.print(" segundos.\r");
}
//Serial.print("          \r");

} /* Fim do loop principal*/

/* Exibição de uma mensagem ao usuário indicando o termino das medições */
Serial.println("Fim das medicoes.");

} /* Fim da função Medir*/

/* Função que exhibe na tela as diferentes opções de intervalos de tempo para realizar as
medições dos Sensores
* A opção selecionada será lida por uma outra Função
*/

void MenuIntervalos()
{
  Serial.println();
  Serial.println("Digite o tempo em segundos");
  Serial.print("Opcao: ");
}

```

```

/*void MenuIntervalos(){
Serial.println();
Serial.println("Escolha uma opcao.");
Serial.println("< 1 > 2 segundos.");
Serial.println("< 2 > 6 segundos.");
Serial.println("< 3 > 1 minuto.");
Serial.println("< 4 > 15 minutos.");
Serial.println("< 5 > 30 minutos.");
Serial.println("< 6 > 1 hora.");
Serial.print("Opcao: ");
}*/

```

/* Função que realiza a leitura da opção do intervalo de tempo selecionado pelo usuário;

- * Se houver bytes a serem lidos no buffer da porta serial que conecta o Arduino com o PC, a leitura da tecla pressionada é efetuada;
- * Uma operação de comparação é feita e a variável "tempoMedidas", que guarda o intervalo de tempo desejado, é atualizada;
- * Se for escolhida uma opção inexistente, uma mensagem de erro é exibida e a função Intervalos é executada novamente.
- * Se não houver bytes (sem envio de dados para o PC), a própria função é chamada novamente, reiniciando o procedimento;
- * A saída da função é realizada somente quando uma opção válida for selecionada.

*/

```

void Intervalos()
{
int buffer = 0;

while( Serial.available() <= 0 )
{
delay(500);
}

if (Serial.available() > 0)
{
buffer = Serial.parseInt();
if(!buffer)
{
MenuIntervalos();
} // Fim if buffer = 0
else
{
tempoMedidas = buffer;
Serial.println(tempoMedidas);
Serial.println("Tempo atualizado...");
} // Fim else
} // Fim if Serial.available
}

```

```

/*void Intervalos(){

if (Serial.available() > 0) {
  op = Serial.read();
  Serial.println(op);
  switch (op) {
    case '1':
      Serial.println("Intervalo de 2 segundos selecionado.");
      tempoMedidas=1;
      break;
    case '2':
      Serial.println("Intervalo de 6 segundos selecionado.");
      tempoMedidas=3;
      break;
    case '3':
      Serial.println("Intervalo de 1 minuto seg selecionado.");
      tempoMedidas=30;
      break;
    case '4':
      Serial.println("Intervalo de 15 minutos selecionado.");
      tempoMedidas=450;
      break;
    case '5':
      Serial.println("Intervalo de 30 minutos selecionado.");
      tempoMedidas=900;
      break;
    case '6':
      Serial.println("Intervalo de 1 hora selecionado.");
      tempoMedidas=1800;
      break;
    default:
      Serial.println("Opcao invalida.");
      MenuIntervalos();
      break;

  } /* Fim do switch

} /* Fim do if principal

else{
  Intervalos();
} /* Fim do else

} /* Fim da função Intervalos */

/* Função que escreve na tela do PC o menu principal do programa com suas diferentes
funcionalidades */
void OpcoesMenu(){

```

```

Serial.println();
Serial.println("Escolha uma opcao.");
Serial.println("< C > Calibrar o Sistema.");
Serial.println("< M > Realizar medidas.");
Serial.println("< P > Parar as medidas ou a calibracao.");
Serial.println("< T > Alterar intervalo entre as medidas.");
//Serial.println("< D > Abilitar e desabilitar o debug.");
Serial.print("Opcao: ");
}

/* Função executada sempre que o botão "reset" do arduino é pressionado ou um novo
upload do código efetuado
* Esta função configura o Arduino: Pinagem e configurações/condições iniciais
*/
void setup() {

/* Os pinos do PWM são configurados como saída */
pinMode(pino1_PWM, OUTPUT);
pinMode(pino2_PWM, OUTPUT);

/*Os pinos do PWM são inicializados*/
analogWrite(pino1_PWM, v_PWM_1);
analogWrite(pino2_PWM, v_PWM_2);
delay(500);

/* A comunica o serial entre o Arduino e o PC é inicializada a uma taxa de 9600 bits
por segundo */
Serial.begin(9600);

/* Escrita na tela do PC do nome do programa*/
Serial.println("\f");
Serial.println("SISTEMA DE MEDICAO DE INDICE DE REFRACAO.");

/* Exibição do Menu Principal, dando inicio ao funcionamento do programa */
OpcoesMenu();
}

/* Loop principal de execução do Arduino
* Se houver bytes a serem lidos no buffer da porta serial que conecta o Arduino com o
PC,
* é realizada a leitura da opção do Menu Principal desejada pelo usuário;
* A função correspondente é então executada com exibição de uma mensagem
indicando o inicio de determinada função;
* Caso seja escolhida uma opção inexistente, é exibida uma mensagem de erro ao
usuário.
* Ao final da execução de cada função, o Menu Principal é exibido novamente dando
um novo inicio ao loop.
* Se não houver nenhum byte a ser lido (sem envio de dados para o PC), uma
instrução vazia é executada e o loop repetido.
*/

```

```

void loop() {

    /* Se a comunicação serial estiver disponível, inicio da leitura da tecla pressionada
    pelo usuário */
    if (Serial.available() > 0) {

        /* Leitura da tecla e posterior exibição da mesma */
        op = Serial.read();
        Serial.println(op);

        /* Verificação de qual tecla foi pressionada pelo usuário, se for uma tecla
        correspondente a uma opção valida,
        * sua respectiva função será executada.
        */
        switch (op) {

            /* Opção de calibração do sistema */
            case 'C':
            case 'c':
                Serial.println("Calibrando o sistema...");
                CalibrarSistema();
                break;

            /* Opção de realização de medidas */
            case 'M':
            case 'm':
                Serial.println("Realizando medidas...");
                Medir();
                break;

            /* Opção para ativar ou desativar o modo Debug */
            case 'D':
            case 'd':
                if (Debug){
                    Debug = false;
                    Serial.println("Debug desabilitado.");
                }
                else{
                    Debug = true;
                    Serial.println("Debug abilitado.");
                }
                break;

            /* Opção para selecionar um novo intervalo de tempo entre as medições */
            case 'T':
            case 't':
                MenuIntervalos();
                Intervalos();
                break;
            case 'P':

```

```
case 'p':
    break;

/* Exibição da mensagem de erro caso uma opção inexistente seja selecionada */
default:
    Serial.println("Opcao invalida.");
    break;

} /* Fim switch - escolha das diferentes funcionalidades do programa */

/* Nova exibição do Menu principal */
OpcoesMenu();

} /* Fim da verificação de disponibilidade da comunicação serial*/
delay(1000);

}
```

Anexo B

Artigos publicados

Revista

Artigo Publicado

WANDERMUR, GISELE; **RODRIGUES, DOMINGOS**; ALLIL, REGINA; QUEIROZ, VANESSA; PEIXOTO, RAQUEL; WERNECK, MARCELO; MIGUEL, MARCO. “Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection”, *Biosensors & Bioelectronics*, v. 54, p. 661-666, 2014.

Artigo submetido

LOPES, RAFAELA; **RODRIGUES, DOMINGOS**; ALLIL, REGINA; WERNECK, MARCELO. “Plastic Optical Fiber Biosensor for Fast Detection of Sulfate-Reducing Bacteria”. *Sensors*, 2017.

Capítulo de livro

WERNECK, M. M.; LOPES, R. N.; BEZERRA, G. K.; **RODRIGUES, D. M. C.**; ARCAS, A. S.; QUEIROZ, V.; DUTRA, F. S. and ALLIL, R. C. S. B. POF Biosensors Based on Refractive Index and Immunocapture Effect. In: Ignacio R. Matias; Satoshi Ikezawa; Jesus M. Corres. (Org.). *Fiber Optic Sensors: Current Status and Future Possibilities*. 1ed. Suíça: Springer International Publishing AG Switzerland, 2016, v. 21, p. 69-94.

Congressos

LOPES, RAFAELA; **RODRIGUES, DOMINGOS**; ALLIL, REGINA and WERNECK, MARCELO. “POF Immunosensor with Antibodies Immobilization for Escherichia coli”, *Paper 52, Proceedings of the 26th International Conference on Plastic Optical Fibres, POF2017*, held at Melia Ria Hotel & Spa, Aveiro, Portugal, ISBN: 978-989-97345-2-4, September 13 to 15, 2017.

RODRIGUES, **DOMINGOS M. C.** ; ALLIL, REGINA C.S.B. ; QUEIROZ, VANESSA M. ; LOPES, RAFAELA N.; WERNECK, MARCELO M. . “Investigation of different shapes of plastic optical fiber sensor for refractometry and detection of bacteria”, *In: 2015 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*, 2015, Pisa. 2015 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC) Proceedings. v. 1. p. 171-175.

WERNECK, M. M.; **RODRIGUES, D. M. C.**; ALLIL, R. C. S. B. ; QUEIROZ, V. ; LOPES, R. N. . “Imunobiosensor para Rápida Identificação de Água Contaminada”. *In: Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica*, 2015, Foz do Iguaçu. Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica, 2015.

RODRIGUES, D. M. C.; ALLIL, R. C. S. B.; QUEIROZ, V.; LOPES, R. N. WERNECK, M. M. “Immunobiosensor for fast detection of bacteria in water using plastic optical fiber (POF) bended”. *In: 24th International Conference on Optical Fiber Sensors - OFS-24*, 2015, Curitiba. International Conference on Optical Fiber Sensors, 2015.

WERNECK, M. M.; LOPES, R. N.; COSTA, G. R. B.; **RODRIGUES, D. M. C.**; QUEIROZ, V.; ALLIL, R. C. “Evaluation and Characterization of a Immunosensor of POF Uncoated, for the Rapid Detection of *Escherichia coli* in Contaminated Water”. *In: 24th International Conference on Plastic Optical Fibers*, 2015, Nuremberg. 24th International Conference on Plastic Optical Fibers, 2015. p. 77-82.

RODRIGUES, D. M. C.; F.V.B.NAZARÉ; WERNECK, M. M. . “Enhanced Plastic Optical Fiber Sensor for Refractometry Based on Amplitude Modulation”. *In: IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference - I2MTC 2014*, 2014, Montevideo. Proceedings of the IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC 2014), 2014. p. 1612-1616.

QUEIROZ, V. ; **RODRIGUES, D.**; ALLIL, R.; WERNECK, M. M. . “ Different POF Sensor Architectures for a Rapid Response *Escherichia coli* Biosensor”. *In: 23rd International Conference on Plastic Optical Fibers - POF2014*, 2014, Yokohama. Proceedings of the 23rd International Conference on Plastic Optical Fibers - POF2014.

WERNECK, M. M.; QUEIROZ, V.; LOPES, R. N. ; **RODRIGUES, D. M. C.**; ALLIL, R. C. S.B. . “Desenvolvimento de um Imunosensor em Fibra Optica Plástica para a Detecção Rápida de Microorganismos Patogênicos em Água de Consumo”. *In: XXII Congresso Latinoamericano de Microbiologia*, 2014, Cartagena. Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2014.

WERNECK, M. M.; R. C. B. ALLIL ; MIGUEL, M. L. ; SILVA-NETO, J. L.; **RODRIGUES. D. M. C.**; RAMBAUSKE, D. “*Escherichia coli* biosensors for environmental, food industry and biological warfare agent detection”. *In: SPIE Defense, Security and Sensing 2013*, 2013, Baltimore. Defense, Security, and Sensing 2013: Sensing for Industry, Environment, and Health; Emerging Technologies, 2013. v. 8718.

RODRIGUES, D. M. C.; WERNECK, M. M.; G.L. WANDERMUR; ALLIL R. C. B. S. “Development and characterization of plastic optical fiber sensors for refractometry based on amplitude modulation”. *In: 22nd International Conference on Plastic Optical Fibers-POF2013*, 2013, Buzios. Proceedings 22nd International Conference on Plastic Optical Fibers-POF2013, 2013.