

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIÓIS NO DESEMPENHO
DE BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS PARA DETECÇÃO DE *Escherichia coli*

Márcia Dalla Pozza

Caxias do Sul, 2016.

Márcia Dalla Pozza

Avaliação da influência de diferentes tióis no desempenho de biossensores magnetoelásticos para detecção de *Escherichia coli*, dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando obtenção do grau de Mestra em Engenharia de Processos e Tecnologias sob orientação do Profº. Dr. Frank P. Missell e co-orientação da Profª. Dra. Mariana Roesch Ely.

Caxias do Sul, 2016.

P893a Pozza, Márcia Dalla

Avaliação da influência de diferentes tióis no desempenho de biossensores magnetielásticos para detecção de escherichia coli / Márcia Dalla Pozza. – 2016.

91 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2016.

Orientação: Frank Patrick Missell.

Coorientação: Mariana Roesch Ely.

1. Biossensor magnetoelástico. 2. Escherichia coli. 3. Compostos tióis. 4. Microscopia de força atômica. I. Missell, Frank Patrick, orient. II. Ely, Mariana Roesch, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Avaliação da Influência de diferentes tióis no desempenho de biossensores magnetoelásticos para detecção de *Escherichia coli*”

Márcia Dalla Pozza

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 12 de dezembro de 2016.

Banca Examinadora:

Dr. Frank Patrick Missell

Orientador

Universidade de Caxias do Sul

Dra. Mariana Roesch Ely

Coorientadora

Universidade de Caxias do Sul

Dr. Antonio Domingues dos Santos

Universidade de São Paulo

Dra. Eloane Malvessi

Universidade de Caxias do Sul

Dra. Camila Baldasso

Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Olir (em memória) e Marinês, por serem meus exemplos de vida, em especial a minha mãe, sempre compartilhando dos meus sonhos e ideais.

Ao meu irmão, Egon, pela compreensão, incentivo e confiança.

Ao Júnior pelo carinho, apoio e companheirismo diário.

A Eliane pelo incentivo e amizade.

Ao Prof Dr. Frank P. Missell pela orientação, atenção e paciência essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Ao LGPRD e a Prof Dra. Mariana Roesch-Ely pela atenção dada e pelos recursos laboratoriais fornecidos.

Ao Prof Dr. Gunther J. L. Gerhardt pela orientação e atenção no início deste trabalho.

Aos colegas de laboratório com quem convivi durante todo o tempo de mestrado, Alessandro, André, Eduardo, Joana, Lucas e Marcele, pela amizade e conhecimento transmitido. Em particular ao André que sempre foi muito prestativo, fornecendo o suporte necessário para o andamento deste projeto.

A Universidade de Caxias do Sul e ao PGEPROTEC pela qualidade na formação e infraestrutura.

Ao CNPq pelos recursos financeiros fornecidos na realização deste trabalho.

E agradeço a todos que de uma forma ou outra contribuíram na realização deste trabalho, sempre me apoiando e incentivando a seguir adiante.

*“Descubra seus limites e verá que
pode ir além deles”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DOS SENSORES MAGNETOELÁSTICOS	20
3.1.1 Corte dimensional nos sensores magnetoelásticos.....	23
3.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS.....	23
3.2.1 Detecção de bactérias por biossensores magnetoelásticos.....	25
3.3 PATÓGENO <i>Escherichia coli</i>	28
3.4 UTILIZAÇÃO DE TIÓIS E ANTICORPOS NA FORMAÇÃO DE ELEMENTOS DE BIOCONJUGADOS.....	31
3.4.1 A formação de camadas auto-organizadas	31
3.4.1.1 A formação de camadas auto-organizadas com o uso de cistamina, a cisteamina e ácido mercaptopropiônico	34
3.4.2 Anticorpos como elemento de bioreconhecimento	36
3.4.2.1 Acoplamento de anticorpos na superfície modificada com tióis	37
3.5 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS	39
3.5.1 A AFM para análise da superfície dos sensores magnetoelásticos	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	44
4.1.1 Liga amorfa magnetoelástica	44
4.1.2 Reagentes, vidrarias e equipamentos	44
4.1.3 Microrganismo	45
4.1.4 Meio de cultura	45
4.1.5 Anticorpos.....	45
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS.....	46
4.2.1 Análises microscópicas dos biossensores magnetoelásticos	46
4.2.2 Análises das frequências de ressonância.....	48
4.2.3 Crescimento e contagem das bactérias	48
4.3 METODOLOGIA	48
4.3.1 Funcionalização da superfície do sensor magnetoelástico	50

4.3.2	Dimensionamento da fita magnetoelástica	50
4.3.3	Aplicações de tióis com soluções de cistamina, cisteamina e ácido mercaptopropiônico sobre os biossensores magnetoelásticos.....	50
4.3.4	Aplicação de anticorpo sobre a superfície do biossensor magnetoelástico modificada com os compostos tióis	50
4.3.5	Contaminação do biossensor com a cultura de bactérias e análise das frequências de ressonância	51
4.3.6	Estimativa do limite de detecção, eficiência e análise estatística dos biossensores magnetoelásticos	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS SENSORES MAGNETOELÁSTICOS.....	53
5.2	CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS	57
5.2.1	Avaliação da superfície com cistamina, contaminação e análise de frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos	57
5.2.2	Avaliação da superfície com ácido mercaptopropiônico, contaminação e análise de frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos	62
5.2.3	Avaliação da superfície com cisteamina, contaminação e análise de frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos	67
5.3	LIMITES DE DETECÇÃO E EFICIÊNCIA DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS.....	71
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS COM O USO DE BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS	73
6	CONCLUSÕES.....	75
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE	86
	ANEXO.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de detecção de bactérias pelo método de cultura (HORIKAWA, 2013).	24
Tabela 2. Concentração de bactérias permitida para fornecimento de leite cru (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO, 2011).	31
Tabela 3. Meios de cultura sólido e líquido para crescimento de <i>Escherichia coli</i> (SEZONOV <i>et al.</i> , 2007).	45
Tabela 4. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para as superfícies rugosa, lisa e polida <i>as cast</i> e com deposição de Cr/Au pelo processo de <i>sputtering</i> .	54
Tabela 5. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para as superfícies rugosa e lisa com deposição de Au pelo processo de eletrodeposição.	55
Tabela 6. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para a deposição de cistamina sobre a superfície de ouro do sensor magnetoelástico.	58
Tabela 7. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para a deposição de ácido mercaptopropiônico sobre a superfície de ouro do sensor magnetoelástico.	63
Tabela 8. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para a deposição de cisteamina sobre a superfície de ouro do sensor magnetoelástico.	68
Tabela 9. Limites de detecção para os biossensores testados com deposição de CYS, MPA e CYSTE para detecção de <i>Escherichia coli</i> .	72
Tabela 10. Eficiência estimada para os biossensores testados com deposição de CYS, MPA e CYSTE para detecção de <i>Escherichia coli</i> .	72
Tabela 11. Dados experimentais de captação de bactérias na superfície do biossensor magnetoelástico com cada diferente tiól estudado obtidos com o ajuste matemático <i>Sigmoidal Logistic</i> .	73
Tabela 12. Análise ANOVA dos dados experimentais obtidos com o ajuste matemático <i>Sigmoidal Logistic</i> para a quantidade de bactérias capturadas na superfície do biossensor magnetoelástico com cada diferente tiól estudado.	73
Tabela 13. Comparação múltipla de médias dos dados estatísticos obtidos com os biossensores magnetoelásticos.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de operação do sensor magnetoelástico (Adaptado de SHEN et al., 2010).	21
Figura 2. Dados teóricos de sensitividade mássica em função do comprimento de sensores magnetoelásticos para detecção de <i>Bacillus anthracis</i> (Adaptado de SHEN et al., 2009).....	23
Figura 3. Sistema de corte de células solares (KULICKE, 2014).....	23
Figura 4. Número de artigos publicados entre os anos de 1985 e 2005 sobre os diferentes métodos de detecção de bactérias (Adaptado de HORIKAWA, 2013).....	24
Figura 5. Princípio operacional de um biossensor (Adaptado de XIE et al., 2009).	26
Figura 6. Sistema de leitura de um biossensor magnetoelástico (Adaptado de HORIKAWA, 2013).....	27
Figura 7. Micrografia de <i>Escherichia coli</i> (MICROBIOLOGY ATLAS, 2011).	28
Figura 8. Curva de crescimento característico de bactérias. a) fase lag b) fase exponencial c) fase estacionária e d) fase de declínio (LEVINSON e JAWETZ, 2005).	29
Figura 9. Crescimento de unidades formadoras de colônia de <i>Escherichia coli</i> em meio de nutrientes adequado (MICROBIOLOGY ATLAS, 2011).	30
Figura 10. Influência da topografia da superfície na formação de monocamadas auto organizadas de alcanotióis (CANCINO, 2008).	32
Figura 11. Monocamada auto-organizada em superfície de ouro (COELHO, 2011).	33
Figura 12. a) etapa de adsorção rápida b) com posterior crescimento lento e c) formação da monocamada auto-organizada (Adaptado de CANCINO, 2008).....	34
Figura 13. a) estrutura química da cistamina (GALLI, 2009) e b) formação da SAM em superfície de Au com o uso de cistamina (MOSSANHA, 2011).	35
Figura 14. a) estrutura química da cisteamina (Adaptado de MENDES, 2006) e b) formação da SAM em superfície de Au com o uso de cisteamina (Adaptado de MOSSANHA, 2011)..	35
Figura 15. a) estrutura química do ácido mercaptopropiônico (NETO, 2012) e b) formação da SAM em superfície de Au com o uso de ácido mercaptopropiônico (MOSSANHA, 2011). ...	36
Figura 16. Representação da estrutura básica do anticorpo (BENJAMINI, 2002).	36
Figura 17. Representação da estrutura básica do anticorpo (Adaptado de BENJAMINI, 2002).....	37
Figura 18. Reação entre o anticorpo e a cistamina intermediada por carbodiimida (HARMANSON,2008a).	38

Figura 19. Conjugação de MPA e anticorpo intermediada por EDC e Sulfo-NHS (HARMANSON, 2008b).....	38
Figura 20. Superfície do sensor com MPA e anticorpo conjugado (Adaptado de FUNG e WONG, 2001).	39
Figura 21. Representação de uma sonda de AFM (SANTOLIN, 2009).	40
Figura 22. Relação entre a força de interação e a distância ponta-amostra para os modos de operação do AFM (COSTA, 2010).	41
Figura 23. Ponta de AFM modificada quimicamente com uma monocamada auto-organizada (Adaptado de TANG et al., 2004).	42
Figura 24. Liga amorfa magnetoelástica Metglas 2826MB3.	44
Figura 25. Representação gráfica do parâmetro de rugosidade média absoluta (Ra) (Adaptado de GADELMAWLA et al., 2002).	46
Figura 26. Representação gráfica do parâmetro de assimetria de distribuição das alturas da superfície a) para superfície com Rsk negativa e b) para superfície com Rsk positiva (Adaptado de GADELMAWLA et al., 2002).	47
Figura 27. Fluxograma do procedimento experimental para elaboração dos biossensores. ...	49
Figura 28. Representação da microscopia de força atômica a) superfície rugosa <i>as cast</i> b) superfície lisa <i>as cast</i> c) superfície polida <i>as cast</i> d) superfície rugosa com recobrimento de Cr/Au por <i>sputtering</i> e) superfície lisa com recobrimento de Cr/Au por <i>sputtering</i> f) superfície polida com recobrimento de Cr/Au por <i>sputtering</i>	53
Figura 29. Representação da microscopia de força atômica a) superfície rugosa com recobrimento de Au por eletrodeposição b) superfície lisa com recobrimento de Au por eletrodeposição.	55
Figura 30. a) espectro RBS do filme de Au depositado por eletrodeposição (Instituto de Física da Universidade de São Paulo – IFUSP) e b) representação da micrografia FESEM comprovando a presença de orifícios na superfície revestida com filme de Au por eletrodeposição.	56
Figura 31. Representação da micrografia FESEM do sensor magnetoelástico de superfície polida revestida com Cr/Au pelo processo de sputtering em diferentes ampliações.	56
Figura 32. Representação da microscopia de força atômica da superfície do biossensor magnetoelástico com cistamina em diferentes áreas de análise.	57
Figura 33. Representação da micrografia FESEM da superfície do biossensor magnetoelástico com cistamina em diferentes ampliações.	58

Figura 34. Variação de frequência de ressonância média dos 5 biossensores testados com deposição de cistamina juntamente com o sensor branco.	59
Figura 35. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de cistamina.....	60
Figura 36. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de cistamina com ajuste <i>Sigmoidal Logistic</i>	61
Figura 37. Representação da microscopia de fluorescência do biossensor com deposição de CYS a) biossensor branco b) biossensor com a presença da bactéria <i>Escherichia coli</i>	62
Figura 38. Representação da microscopia de força atômica da superfície do biossensor magnetoelástico com ácido mercaptopropiônico em diferentes áreas de análise.....	63
Figura 39. Representação da micrografia FESEM da superfície do biossensor magnetoelástico com ácido mercaptopropiônico em diferentes ampliações.....	64
Figura 40. Variação de frequência de ressonância média dos 5 biossensores testados com deposição de ácido mercaptopropiônico juntamente com o sensor branco.....	64
Figura 41. a) anticorpos ligados em superfície com SAM terminada em NH ₂ e b) anticorpos ligados em superfície com SAM terminada em COOH (Adaptado de CHEN et al., 2003).....	65
Figura 42. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de ácido mercaptopropiônico.....	65
Figura 43. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de ácido mercaptopropiônico com ajuste <i>Sigmoidal Logistic</i>	66
Figura 44. Representação da microscopia de fluorescência do biossensor com deposição de MPA a) biossensor branco b) biossensor com a presença da bactéria <i>Escherichia coli</i>	67
Figura 45. Representação da microscopia de força atômica da superfície do biossensor magnetoelástico com cisteamina em diferentes áreas de análise.	67
Figura 46. Representação da micrografia FESEM da superfície do biossensor magnetoelástico com cisteamina em diferentes ampliações.	68
Figura 47. Variação de frequência de ressonância média dos 5 biossensores testados com deposição de cisteamina juntamente com o sensor branco.....	69
Figura 48. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de cisteamina.	69
Figura 49. Bactérias captadas na superfície do biossensor com deposição de cisteamina com ajuste <i>Sigmoidal Logistic</i>	70
Figura 50. Representação da microscopia de fluorescência do biossensor com deposição de CYSTE a) biossensor branco b) biossensor com a presença da bactéria <i>Escherichia coli</i>	71

NOMENCLATURAS

Ac – Anticorpo

AC – Corrente alternada

AFM – *Atomic Force Microscope*

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CFM – *Chemical Force Microscopy*

COOH – Ácido carboxílico

Cr – Cromo

CTI – Centro de Tecnologia da Informação

CYS – Cistamina

CYSTE – Cisteamina

DC – Corrente contínua

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E. coli – *Escherichia coli*

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

ELISA – *Enzyme linked Immunosorbent Assay*

Fab – *Fragment antigen binding*

Fc – Fragmento cristalizável

FESEM – *Field emission scanning electron microscopy*

GPa – GigaPascal

H – Hidrogênio

IB – Instituto de Biotecnologia

IFUSP – Instituto de física da Universidade de São Paulo

Ig - Imunoglobulina

kg - Quilograma

LCM – Laboratório de Caracterização Magnética

LGPRD – Laboratório de genômica, proteômica e reparo de DNA

m – Metro

mM – Milimolar

MPA – Ácido mercaptopropiônico

nm – Nanômetros

N – Newton

NH₂ – Amina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

Ra – Rugosidade média absoluta

RBS – *Rutherford Backscattering Spectroscopy*

Rq – Desvio padrão da distribuição das alturas da superfície

Rsk – Assimetria do perfil de distribuição (*skewness*)

rpm – Rotações por minuto

S - Enxofre

SAM – *Self Assembled Monolayer*

SM – Sensores magnetoelásticos

SPM – *Scanning Probe Microscopy*

Sulfo-NHS – N-hidroxisulfosuccinimida

UFC – Unidades formadoras de colônia

µm – Micrômetro

µL - Microlitro

RESUMO

Os métodos de detecção de patógenos, em geral, requerem dias para identificação de microorganismos patogênicos, havendo interesse em uma detecção rápida e precisa em tempo real, os biossensores magnetoelásticos são uma alternativa promissora. Os sensores magnetoelásticos são dispositivos de detecção que podem ser acessados remotamente e sua aplicação no método de biossensoriamento possui sensibilidade mássica para espécies biológicas, oferecendo confiabilidade na detecção de patógenos como *Escherichia coli*. Neste trabalho, tiras amorfas Metglas 2826MB3 foram revestidas com Au pelos processos de deposição de *sputtering* e eletrodeposição e segmentadas em lâminas de 5 x 1 mm. Foram avaliados os parâmetros de rugosidade média absoluta (Ra), desvio padrão das alturas da superfície (Rq) e simetria do perfil de distribuição (Rsk) com a técnica de microscopia de força atômica aplicada em três superfícies distintas (lisa, rugosa e polida). Buscando melhorar a sensibilidade de detecção do dispositivo, avaliou-se a influência de diferentes tióis no desempenho de biossensores magnetoelásticos. Os compostos utilizados diferem no tamanho da cadeia carbônica e no grupamento terminal que liga-se ao anticorpo. Sobre a superfície polida revestida com Cr/Au pelo processo de *sputtering* depositou-se os compostos cistamina (CYS), cisteamina (CYSTE) e ácido mercaptopropiônico (MPA), seguido por anticorpos. Os biossensores foram expostos a solução de bactéria *E. coli* e a variação da frequência de ressonância foi medida com um analisador de rede. Foi possível constatar que a superfície polida revestida com Cr/Au pelo processo de *sputtering* apresentou menores valores de Ra e Rq e melhor perfil de distribuição (Rsk) em relação às demais superfícies estudadas. Os biossensores com o composto MPA mostraram um aumento na captação de bactérias em relação aos biossensores com os compostos CYS e CYSTE, porém altos valores de desvio padrão foram observados, dificultando a reprodutibilidade e confiabilidade do biossensor. Os biossensores testados com CYSTE apresentaram maior eficiência e menor limite de detecção em relação aos biossensores testados com CYS, apontando um melhoramento na utilização deste composto. Os resultados foram favoráveis para a detecção da bactéria *E. coli*, evidenciando que o tamanho da cadeia carbônica e o grupamento terminal influenciam na eficácia da imobilização deste patógeno em biossensores magnetoelásticos.

Palavras-chave: biossensores magnetoelásticos, *Escherichia coli*, AFM, frequência de ressonância.

ABSTRACT

The magneto-elastic sensors are detection devices that can be remotely accessed and applied as biosensors having a mass sensitivity for detection of biological specimens, offering reliability in the detection of pathogens such as *Escherichia coli*. The pathogen detection methods generally require days to identify the pathogenic micro-organism, so there is interest in a rapid and accurate detection in real time. The magneto elastic biosensors are a promising alternative for this task. In this work, amorphous ribbons of Metglas 2826MB3 were coated with Au by the processes of sputtering and electrodeposition and segmented into 5 x 1 mm strips. We evaluated the roughness parameters arithmetic average height (Ra), root mean square roughness (Rq) and skewness (Rsk) using atomic force microscopy applied on three different surfaces (smooth, rough and polished). Seeking to improve the detection sensitivity of the device, the performance of the biosensors was evaluated in terms of the effects of different thiols on their performance. The compounds used differ in the size of the carbon chain and the terminal grouping which binds to the antibody. On the polished surface coated with Cr/Au by sputtering, we deposited the compounds cystamine (CYS), mercaptopropionic acid (MPA) and cysteamine (CYSTE), followed by antibodies. The biosensors were exposed to the bacteria *E. coli* in solution and the variation of the resonance frequency was measured with a network analyzer. It was found that the polished surface coated with Cr/Au by sputtering process showed lower values of Ra and Rq and a better distribution profile (Rsk) in relation to other surface studied. Biosensors employing the compound MPA showed an increase in attracting bacteria in relation to biosensors with CYS and CYSTE, but high standard deviations were observed, thus hampering the reproducibility and reliability of the biosensor. Biosensors tested with CYSTE showed higher efficiency and lower detection limit with respect to biosensors tested with CYS, indicating an improvement in the use of this compound. The results were favorable for the detection of *E. coli*, indicating that the size of carbon chain and the terminal grouping influence the effectiveness of immobilization of the magneto elastic biosensors.

Key-words: magneto-elastic biosensor, *Escherichia coli*, AFM, resonant frequency.

1 INTRODUÇÃO

Os sensores magnetoelásticos (SM) são dispositivos que podem ser monitorados sem a utilização de ligações elétricas sendo amplamente utilizados na quantificação precisa de parâmetros como temperatura, umidade, pressão, viscosidade, densidade de líquidos, entre outros. O funcionamento dos SM consiste na excitação de ondas por meio de um campo magnético aplicado externamente de forma que a frequência de ressonância possa ser mensurada por uma bobina de captação situada fora da área do sensor (GRIMES *et al.*, 2002).

Um excelente material para uso como plataforma de sensores magnetoelásticos é uma classe de fitas de material amorfo proveniente da empresa Metglas Company. A liga Metglas 2826MB3, composta aproximadamente por ferro, níquel, molibdênio e boro, é um dos materiais disponíveis comercialmente com potencial para utilização destes sensores (GRIMES *et al.*, 1999; METGLAS, 2011).

O dimensionamento dos sensores influencia diretamente na sensibilidade do dispositivo. A deposição de ouro (Au) possibilita tornar a superfície funcionalizada para a aplicação de compostos orgânicos como a cistamina (CYS), a cisteamina (CYSTE) e o ácido mercaptopropiônico (MPA), remetendo a formação de monocamadas auto-organizadas (SAM - *Self Assembled Monolayer*) na superfície do sensor magnetoelástico.

Além da sensibilidade do dispositivo, os biossensores magnetoelásticos, oferecem confiabilidade na detecção de patógenos em tempo real, podendo ser aplicados na medição de componentes nos fluidos biológicos, na detecção de microrganismos e toxinas, no monitoramento de temperatura, umidade, pressão, entre outros (GRIMES *et al.*, 2011). Para a detecção de um patógeno específico, elementos biocojugados são formados mediante a escolha do anticorpo responsável pela ligação com a bactéria presente no meio contaminante (MOSSANHA, 2011; RUAN *et al.*, 2004).

Em 2011, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Europa registrou casos de infecção pela bactéria *Escherichia coli*, com mortes principalmente na Alemanha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Em maio de 2016, a empresa americana *General Mills*, produtora de farinha de trigo das marcas *Gold Medal*, *Wondra* e *Signature Kitchen*, recolheu determinados lotes de seu produto dos supermercados por haver relação com um surto da bactéria *E. coli* em 20 estados norte-americanos. *E. coli* é o agente patogênico causador de infecções do trato urinário e infecções na corrente sanguínea. A transmissão pode ocorrer pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente carne e leite crus ou mal cozidos, e também pelo consumo de vegetais crus, sendo necessário o controle deste patógeno na

1 INTRODUÇÃO

indústria alimentar e no setor hospitalar. Os métodos de detecção, como ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e PCR (*polymerase chain reaction*), requerem dias para identificação do patógeno, havendo interesse em uma detecção rápida e precisa em tempo real. Os biossensores magnetoelásticos mostram-se como um método alternativo na detecção e quantificação de patógenos como a *E. coli* de forma reprodutível e confiável (THE WALL STREET JOURNAL, 2016; FOOD BORN BURDEN, 2016; MOROSINI, 2010).

O desenvolvimento de técnicas de microscopia de varredura por sonda, como a microscopia de força atômica (AFM - *Atomic Force Microscope*) é uma poderosa ferramenta no estudo da organização estrutural das monocamadas auto-organizadas. Uma vez que a deposição da SAM e posterior ligação com o anticorpo específico do patógeno-alvo é fortemente afetada pela rugosidade da superfície, esta técnica desempenha um importante papel na quantificação deste parâmetro (LOVE *et al.*, 2005; NETO *et al.*, 2007).

Este trabalho tem por objetivo analisar a rugosidade de fitas amorfas por meio de AFM e avaliar a influência de diferentes tióis, que variam em estrutura, tamanho da cadeia carbônica e grupamento terminal, no desempenho de detecção e quantificação da bactéria *E. coli* com o uso de biossensores magnetoelásticos, contribuindo para o desenvolvimento da inovação e tecnologia nacional, buscando melhorar a sensibilidade de detecção do dispositivo, oferecendo uma detecção remota, rápida e confiável.

O Laboratório de Caracterização Magnética da UCS (LCM-UCS) trabalha há alguns anos com aplicações de sensores magnetoelásticos e, mais recentemente, com colaboração do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparado de DNA da UCS (LGPRD-UCS), em aplicações biológicas para a detecção de patógenos em soluções via sua aderência em um filme depositado sobre o sensor. Aplicações dos sensores magnetoelásticos no processo de secagem de argila, detecção de bactérias, desenvolvimento de um dispositivo de detecção portátil e ainda sensores de tensão são alguns dos temas estudados pelo grupo de pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a superfície de biossensores magnetoelásticos por meio de microscopia de força atômica e avaliar a influência de diferentes tióis no desempenho destes biossensores para detecção de *E. coli*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar a operação do AFM a fim de analisar as superfícies rugosa, lisa e polida do sensor magnetoelástico obtendo imagens que permitam a quantificação da rugosidade presente.
- 2) Funcionalizar a superfície do sensor magnetoelástico com deposição de Au pelos métodos de eletrodeposição e de *sputtering*.
- 3) Analisar as superfícies revestidas com Au por AFM e comparar os métodos de deposição perante avaliação da rugosidade presente.
- 4) Biofuncionalizar a superfície dos sensores magnetoelásticos com a deposição dos compostos cistamina, cisteamina e ácido mercaptopropiônico e analisar em AFM e FESEM.
- 5) Detectar e quantificar a bactéria *E. coli* utilizando o biossensor magnetoelástico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DOS SENSORES MAGNETOELÁSTICOS

Os sensores magnetoelásticos são utilizados comercialmente como marcadores antifurto. Podem ser dimensionados em tiras com variadas medidas de comprimento, de acordo com a utilização, respeitando-se a relação 5:1 entre o comprimento (L) e largura (W). Esta relação é suficiente para que a primeira vibração possa ser aproximada como vibração longitudinal, uma vez que, a aplicação de um campo magnético alternado ao longo da direção longitudinal do sensor altera a forma do sensor e este vibra na mesma direção devido à interação magnetoelástica (GRIMES *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2010).

Procedente da empresa americana Metglas Company, a liga Metglas 2826MB3 é um dos materiais disponíveis comercialmente com potencial para utilização destes sensores. Com composição aproximada, em peso, de ferro (45%), níquel (45%), molibdênio (7%) e boro (3%), esta liga possui magnetostricção de 12 ppm, massa específica de 7900 kg.m^{-3} , módulo de Young de aproximadamente 105 GPa e razão de Poisson de 0,33 (METGLAS, 2011; SHEN *et al.*, 2010; MOSCON, 2009). Devido ao processo de fabricação, denominado *Melt Spinning*, os lados das fitas apresentam diferentes rugosidades. A superfície da parte superior, voltada para o ambiente é lisa, enquanto que a topografia do lado inferior, voltado para a roda de conformação apresenta bolhas de ar, tornando esta superfície rugosa.

O funcionamento dos sensores magnetoelásticos consiste em excitar ondas no sensor por meio de um campo magnético aplicado externamente, de forma que a frequência de ressonância do sensor possa ser mensurada por uma bobina de captação situada fora da área do sensor. A frequência de ressonância da vibração longitudinal de um material plano, submetido a um campo magnético alternado, onde a espessura do material (t) é muito menor do que seu comprimento (L) e largura (W) pode ser descrita a partir da relação mostrada na Equação 1.

$$f_0 = \frac{1}{2L} \sqrt{\frac{E}{\rho(1-\sigma)}}$$

(1)

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Onde E , ρ , σ , e L são, respectivamente, o módulo de elasticidade (Young), a massa específica, a razão de Poisson e o comprimento (GRIMES, 2002; SHEN *et al.*, 2010). Vibrações longitudinais são geradas pelo sensor magnetoelástico quando este é excitado por um campo magnético. Estas vibrações produzem ondas elásticas do centro para os extremos, gerando ressonância que pode ser detectada acusticamente, opticamente ou magneticamente (GRIMES *et al.*, 2011).

A resposta do sensor pode ser detectada através de medidas em função do tempo ou da frequência. A segunda alternativa é simples. Um gerador de sinais excita uma bobina em torno do sensor e a resposta é obtida de uma bobina secundária usando um amplificador *lock-in* (SHEN *et al.*, 2010). A Figura 1 ilustra o mecanismo operacional do sensor magnetoelástico.

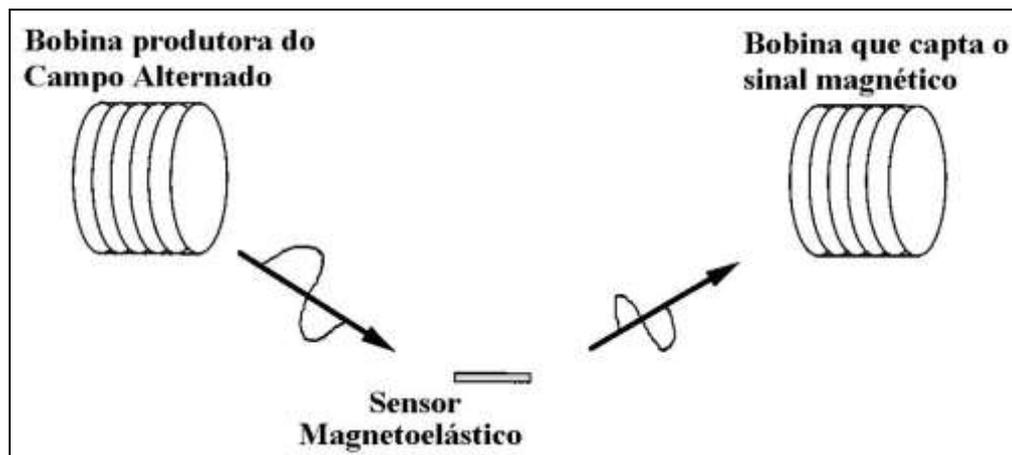


Figura 1. Sistema de operação do sensor magnetoelástico (Adaptado de SHEN *et al.*, 2010).

A bobina de captação (*pick-up coil*) é capaz de determinar a frequência produzida pelo sensor. Esta bobina é conectada em um analisador de rede, que emite um sinal em corrente alternada (AC) variando a frequência, a fim de excitar magneticamente o sensor. Quando ocorre ressonância entre o sensor e o sinal emitido, o coeficiente de reflexão apresenta uma queda que é detectada no analisador. De acordo com as propriedades e o tamanho da fita magnetoelástica, a partir dos resultados teóricos e em um intervalo de frequência conhecido, o sinal resultante é comparado com o sinal incidente. A magnitude do pico de ressonância pode ser aumentada aplicando um campo de corrente contínua (DC bias) em voltagem apropriada sobre o solenoide.

A variação da frequência de ressonância para sensores de mesma dimensão, porém com diferentes aplicações de campo magnético, é relacionada ao efeito ΔE , uma vez que o

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

módulo de elasticidade é dependente do estado de magnetização do sensor e estes apresentam diferentes respostas na frequência (HORIKAWA, 2013; GRIMES *et al.*, 2011). Shen *et al.* (2010) afirmam que, dependendo do meio o qual o sensor está exposto, forças de amortecimento afetam a superfície de maneira à impedir as oscilações vibracionais, causando diminuição na frequência do sensor magnetoelástico. O efeito de amortecimento também é causado quando um carregamento de massa é aplicado uniformemente na superfície. Se um aumento de massa é causado na superfície do sensor, a frequência de ressonância irá diminuir proporcionalmente. A Equação 2 relaciona a mudança de frequência de ressonância causada pelo aumento de massa na superfície para temperatura e umidade constantes. A sensibilidade (S_m) representa esta relação entre o aumento de massa e a mudança de frequência de ressonância do sensor (Equação 3) (HORIKAWA *et al.*, 2011, HORIKAWA, 2013).

$$\frac{\Delta f}{\Delta m} \approx -\frac{f}{2M} \quad (2)$$

$$S_m = -\frac{5}{4\rho L^3 t} \sqrt{\frac{E}{\rho(1-\sigma)}} \quad (3)$$

Na Equação 2, Δf , Δm , f e M representam, respectivamente, a mudança da frequência de ressonância, a variação de massa na superfície, a frequência de ressonância inicial e a massa do dispositivo. Na Equação 3, E , ρ , L , t e σ são respectivamente o módulo de elasticidade (Young), a massa específica, o comprimento, a espessura e a razão de Poisson. Uma vez que E , ρ e σ são constantes, a sensibilidade da medida da massa será dependente da espessura e do comprimento do sensor, deste modo, conforme apresenta a Figura 2, a redução no comprimento e na espessura do sensor implica no aumento da sensibilidade na detecção de massa (SHEN *et al.*, 2009).

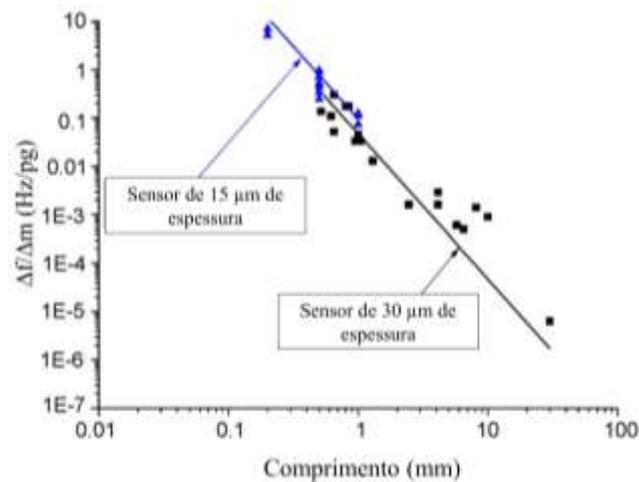


Figura 2. Dados teóricos de sensibilidade mássica em função do comprimento de sensores magnetoelásticos para detecção de *Bacillus anthracis* (Adaptado de SHEN *et al.*, 2009).

3.1.1 Corte dimensional nos sensores magnetoelásticos

O corte dos sensores magnetoelásticos é realizado para reduzir o tamanho a nível milimétrico e com precisão através de uma serra automática (micro serra). Este equipamento também é utilizado para corte de células solares para captação de energia, conforme ilustra a Figura 3. Para sensores, geralmente utiliza-se tiras de 30 mm a 0,5 mm de comprimento, respeitando-se a relação 5:1 entre comprimento e altura (SHEN *et al.*, 2010).

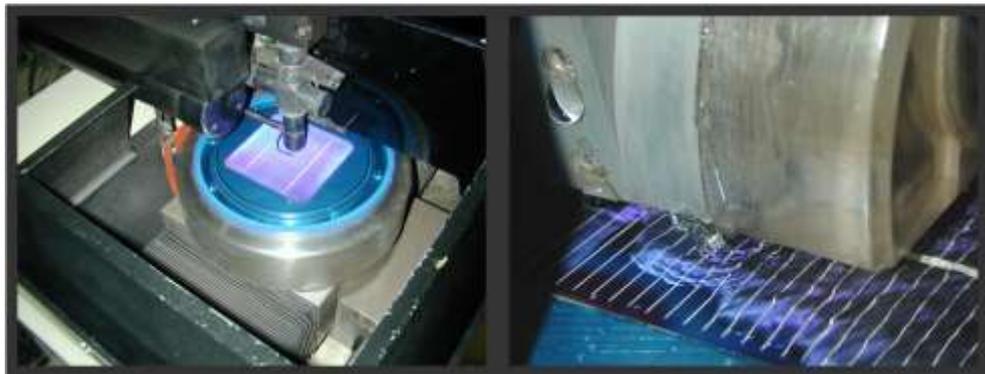


Figura 3. Sistema de corte de células solares (KULICKE, 2014).

3.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS

Uma pesquisa, realizada por Horikawa (2013), aponta o número de artigos publicados entre os anos de 1985 e 2005 sobre os diferentes métodos de detecção de bactérias (Figura 4).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

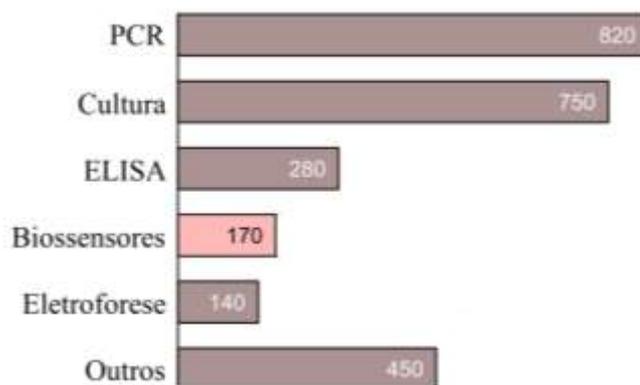


Figura 4. Número de artigos publicados entre os anos de 1985 e 2005 sobre os diferentes métodos de detecção de bactérias (Adaptado de HORIKAWA, 2013).

Os métodos de detecção mais encontrados foram de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), cultura e ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) devido à alta confiabilidade que apresentam. Dentre as aplicações médicas e biológicas da técnica de PCR, destacam-se o diagnóstico de doenças hereditárias e infecciosas e testes de paternidade. Este método é altamente específico e preciso, contudo apresenta desvantagens como a necessidade de conhecimento da sequência de DNA a ser amplificada e também, por se tratar de uma técnica muito sensível (com limite de detecção de simples célula), há facilidade de contaminação da amostra por DNA estranho (LEE *et al.*, 2014; BOTARO, 2012; HORIKAWA, 2013). O método de detecção baseado em cultura é capaz de identificar um número pequeno de bactérias patogênicas. Dependendo da espécie bacteriana a ser identificada, este método apresenta desvantagem no tempo de diagnóstico, podendo levar de dias a semanas para obtenção de resultados, conforme apresenta a Tabela 1 (HORIKAWA, 2013).

Tabela 1. Exemplos de detecção de bactérias pelo método de cultura (HORIKAWA, 2013).

Patógeno detectado	Tempo de ensaio (dias)
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	2
<i>Salmonella enteritidis</i>	4 à 8
<i>Listeria monocytogenes</i>	> 7
<i>Campylobacter fetus</i>	14 à 16

No teste ELISA, um antígeno específico da bactéria é ligado ao anticorpo. Este método necessita de um tempo alto para execução, degradação de reagentes e alto valor agregado, levando cerca de horas à dias para diagnóstico, porém oferece alta sensibilidade

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

(limite de detecção entre 10^3 e 10^6 UFC.mL⁻¹) e reprodutibilidade na detecção do patógeno-alvo (LEE *et al.*, 2014 ; SINGHA *et al.*, 2009).

Nos últimos cinco anos, o número de publicações sobre o método de biossensoriamento aumentou, aproximadamente, para 700 com aplicações em patógenos diversos. A utilização de biossensores para detecção de bactérias patogênicas apresenta-se como tecnologia emergente em relação a estes métodos, exibindo resultados confiáveis em tempo real (LEE *et al.*, 2014).

3.2.1 Detecção de bactérias por biossensores magnetoelásticos

A possibilidade de detectar pequenas massas (na ordem de picogramas) com sensibilidade para espécies biológicas em tempo real com sensores que podem ser acessados remotamente desprende muitas possibilidades. Uma consideração, além da sensibilidade do dispositivo, é a necessidade deste de ser produzido de forma reprodutível e confiável. Os biossensores magnetoelásticos podem ser aplicados na identificação e tratamento de doenças, na medição de componentes nos fluidos biológicos, na detecção de microrganismos e toxinas, no monitoramento de temperatura, umidade, pressão, entre outros (GRIMES *et al.*, 2011).

A deposição de ouro possibilita tornar a superfície dos sensores bioativa para a aplicação de compostos orgânicos, podendo ser realizada pelos métodos de *sputtering* ou eletrodeposição. O método de *sputtering* utiliza uma camada de cromo (Cr) intermediária com a finalidade de melhorar a adesão do Au na superfície do sensor magnetoelástico. A camada de ouro é utilizada para proteger o material à corrosão e proporcionar uma superfície para o qual o elemento bioativo possa ser facilmente conectado. As camadas aplicadas (Cr e Au) são de aproximadamente 100 nm e relativas ao tempo de deposição (SHEN *et al.* 2010, RUAN *et al.*, 2004). A técnica de eletrodeposição é uma alternativa na deposição de filmes finos devido ao baixo custo e flexibilidade, uma vez que não necessita de um sistema de vácuo para realizar o processo. Este método refere-se à deposição de um metal ou uma liga a partir de um eletrólito através da passagem de corrente entre dois eletrodos localizados neste eletrólito. Desta forma os íons metálicos são reduzidos a átomos de metais em um eletrodo, conhecido como cátodo ou eletrodo de trabalho (NABIYOUNI e FARAHANI, 2009).

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo de detecção, contendo um componente biológico ativo (enzimas, anticorpos, antígenos, células entre outros) diretamente acoplado à superfície de um transdutor, o qual converte um sinal biológico em sinal elétrico

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

(FERREIRA *et al.*, 2006). O princípio de funcionamento de um biossensor magnetoelástico é ilustrado esquematicamente na Figura 5 (XIE *et al.*, 2009).

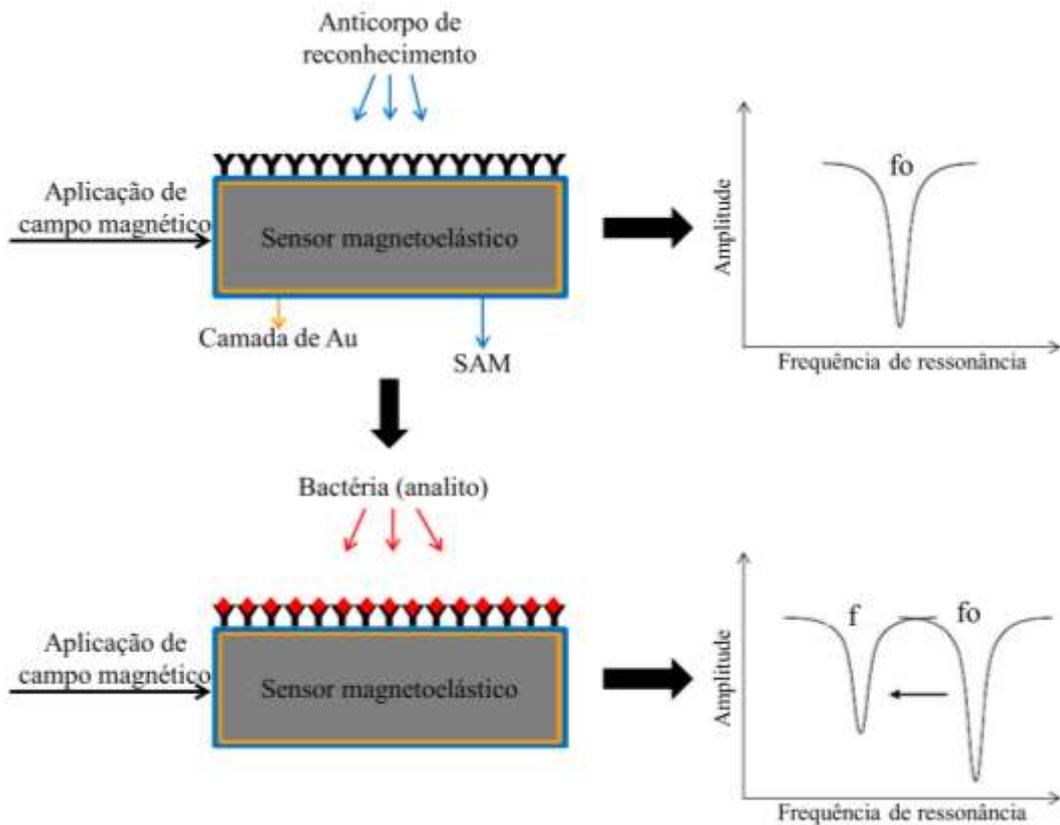


Figura 5. Princípio operacional de um biossensor (Adaptado de XIE *et al.*, 2009).

A determinação da frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos ocorre através de um analisador de redes, conectado a uma bobina de captação (*pick up coil*), o qual emite um sinal AC incidente a fim de excitar magneticamente a vibração longitudinal do biossensor, conforme apresenta a Figura 6. Relacionando-se a dimensão e as propriedades do biossensor, o sinal resultante é comparado com o sinal incidente em um intervalo de frequências conhecidas (HORIKAWA, 2013).

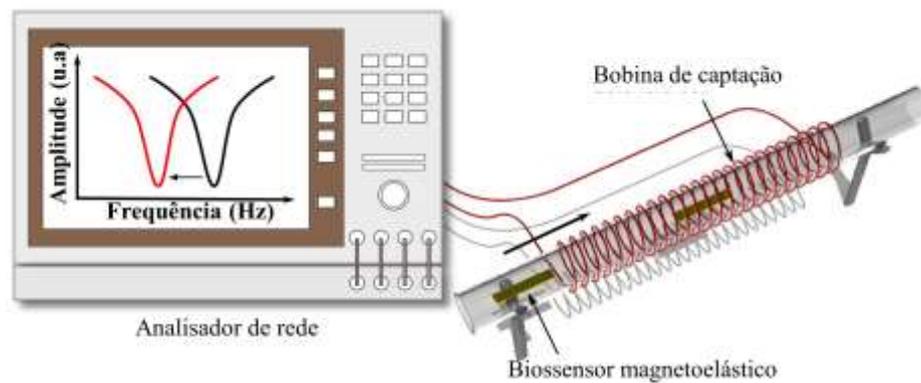


Figura 6. Sistema de leitura de um biossensor magnetoelástico (Adaptado de HORIKAWA, 2013).

A imobilização do patógeno alvo na superfície do biossensor provoca um aumento de massa e, conseqüentemente, a diminuição da frequência de ressonância (descrito pela Equação 2). Dependendo do tamanho do sensor, este possui um limite mínimo de massa detectável (Δm_{min}), descrito pela Equação 4, relacionado com o limite de detecção do sistema de leitura das frequências.

$$\Delta m_{min} = \frac{\Delta f_{min}}{Sm} \quad (4)$$

Onde Δf_{min} corresponde à mudança de frequência mínima. Conhecendo-se o valor de Δf_{min} e a massa do patógeno alvo, a partir da Equação 5, é possível determinar o número mínimo de bactérias detectadas (N_{min}) na superfície do biossensor (JAIN *et al.* 2001; HORIKAWA, 2013).

$$N_{min} = \frac{\Delta m_{min}}{(massa\ do\ patógeno)} \quad (5)$$

A rugosidade da superfície dos sensores magnetoelásticos é importante para caracterização dos filmes imobilizados e da morfologia das moléculas. Estudos realizados por Possan (2015) afirmam que uma menor rugosidade da superfície pode melhorar as verificações de frequência de ressonância, propiciando um melhor acoplamento da monocamada auto-organizada. Uma topografia rugosa está relacionada com a falta de uniformidade das camadas que fazem parte da construção do biossensor.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Possan *et al.* (2016) também relatam que uma superfície rugosa apresenta captação da bactéria *E. coli* inferior em comparação ao biossensor de superfície lisa. A análise de um biossensor polido também apresentou maiores variações na frequência de ressonância, significando maior captação de bactérias em relação à superfície rugosa. O polimento na superfície do biossensor facilita a deposição da monocamada auto-organizada, melhorando a compactação e posterior ligação com os anticorpos.

3.3 PATÓGENO *Escherichia coli*

Relatada em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich (1857-1911) e pertencente à família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete (Figura 7). *E. coli* é um dos organismos mais comuns envolvidos em infecções na corrente sanguínea e é capaz de adquirir resistência antimicrobiana facilmente (MAINIL, 2013). Podendo ser encontrada no trato intestinal de seres humanos e animais, esta bactéria pode crescer em meios anaeróbios ou aeróbios e é um indicador de contaminação na indústria alimentar, estando presente em alimentos frescos. *E. coli* também é a causa mais comum de infecções do trato urinário, como a cistite e a pielonefrite (ADÁNYI *et al.*, 2006 ; STROHL *et al.*, 2004).

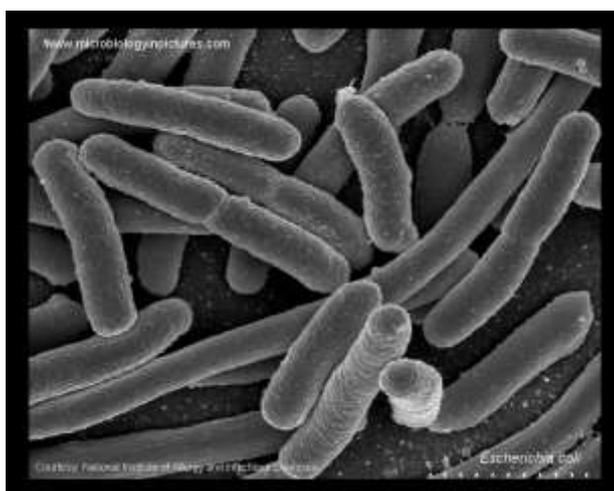


Figura 7. Micrografia de *Escherichia coli* (MICROBIOLOGY ATLAS, 2011).

A dimensão deste microrganismo varia entre 2 a 6 μm de comprimento e 1 a 1,5 μm de largura e o meio Luria-Bertani é amplamente utilizado para cultivo desta bactéria, pois permite rápido crescimento. *E. coli* é um organismo que cresce em temperaturas desde 7 $^{\circ}\text{C}$ até 50 $^{\circ}\text{C}$, com temperatura ótima de crescimento a 37 $^{\circ}\text{C}$.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Se um número de bactérias é inoculado no meio nutriente líquido e a contagem das bactérias é realizada em intervalos frequentes, as fases características de uma curva de crescimento podem ser observadas, conforme ilustra a Figura 8 (SEZONOV *et al*, 2007; LEVINSON e JAWETZ, 2005; ADAMS e MOSS, 1997; NATURDATA, 2011).

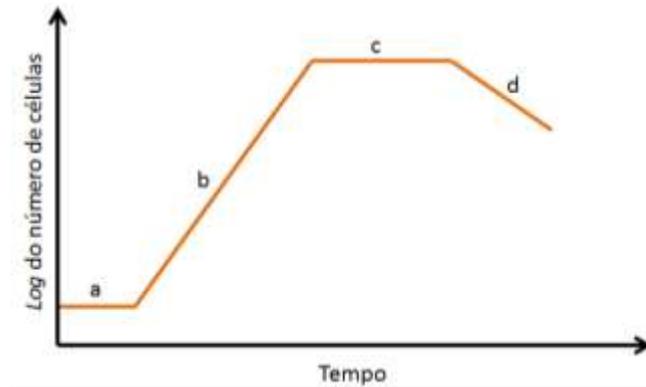


Figura 8. Curva de crescimento característico de bactérias. a) fase lag b) fase exponencial c) fase estacionária e d) fase de declínio (LEVINSON e JAWETZ, 2005).

Os métodos de contagem da *E. coli* podem ser feitos de modo direto, como a centrifugação e massa seca ou determinações de forma indireta como a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas (Figura 9). No método direto de centrifugação um volume de cultura é centrifugado em um tubo capilar e a altura do sedimento é uma medida de massa. Conhecendo-se o tamanho do microrganismo é possível calcular o número deste. Este método não apresenta exatidão, pois, deve-se considerar que as medidas de volume úmido são pouco sensíveis, podendo ser aplicado na quantificação de leveduras, uma vez que são maiores e mais volumosas que bactérias. Na determinação em massa seca, a massa seca do microrganismo é definida por unidade de volume de cultura, sendo mais satisfatória, pois, não leva em conta o conteúdo aquoso. Este método apresenta como desvantagem a necessidade de grandes quantidades de cultura a fim de evitar erros nas medidas.

No método indireto de contagens de UFC, amostras de diluições seriadas são espalhadas em placas contendo meio de cultura sólido adequado e incubadas de forma a permitir o desenvolvimento de colônias isoladas. O número de UFC.mL⁻¹ é obtido considerando a diluição utilizada, variando de 30 à 300 por placa. Nesta técnica todas as células permanecem na superfície do meio e a precisão depende da dispersão homogênea dos organismos em cada diluição. Agitar a cultura antes de retirar a amostra e realizar diversas placas para cada diluição contribuem para minimizar erros. O uso de culturas em fase lag e/ou estacionária também aumenta a exatidão do método uma vez que o número de colônias

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

contadas representa o número de organismos vivos, não considerando aqueles que possam ter morrido durante o plaqueamento (BARBOSA e TORRES, 1999; BLACK, 2002; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).



Figura 9. Crescimento de unidades formadoras de colônia de *Escherichia coli* em meio de nutrientes adequado (MICROBIOLOGY ATLAS, 2011).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - *Center for Disease Control and Prevention*) estima que 48 milhões de pessoas adoecem por ano nos Estados Unidos por doenças transmitidas através de alimentos, com cerca de 3000 mortes. Ainda de acordo com o CDC, o tempo médio para diagnóstico de *E. coli* é de 1 à 3 dias a partir da coleta da amostra. A detecção e quantificação rápida são primordiais para ambientes que requerem o controle de patógenos, sendo a utilização de biossensores magnetoelásticos como um método alternativo para esta função, podendo ser acessados remotamente de forma reprodutível e confiável.

Padrões e regulamentos são desenvolvidos por agências com o objetivo de assegurar que o alimento recebido pelo consumidor seja saudável, seguro e de qualidade. Além da farinha de trigo relatada pela CDC, o leite também é um alimento comumente associado a contaminações com bactérias e outras impurezas, sendo essencial o controle da qualidade deste produto desde a saída do produtor rural até o consumo. Para o controle da qualidade do produto, é muito importante a utilização de um método robusto e sensível, o que torna os biossensores magnetoelásticos uma alternativa para as análises.

A Tabela 2 apresenta a quantidade máxima de bactérias permitida pela legislação para o fornecimento de leite cru, conforme descreve a Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2. Concentração de bactérias permitida para fornecimento de leite cru (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO, 2011).

	Concentração de bactérias
De 01/07/2014 à 30/06/2016 para regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. De 01/07/2015 à 30/06/2017 para as regiões Norte e Nordeste	300 000 UFC.mL ⁻¹
A partir de 01/07/2016 para regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. A partir de 01/07/2017 para as regiões Norte e Nordeste	100 000 UFC.mL ⁻¹

O limite de detecção de patógenos com o uso de biossensores magnetoelásticos aponta para 10^2 a 10^4 UFC.mL⁻¹, podendo ser aplicados com segurança e confiabilidade no controle da qualidade de leite e indústria alimentícia em geral (XIE *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2009, RUAN *et al.*, 2003, JING *et al.*, 2010, HUANG *et al.*, 2010; CHAI *et al.*, 2013; POSSAN *et al.*, 2016).

3.4 UTILIZAÇÃO DE TIÓIS E ANTICORPOS NA FORMAÇÃO DE ELEMENTOS DE BIOCONJUGADOS

Para a detecção de um patógeno específico, elementos bioconjugados são formados mediante a escolha do anticorpo responsável pela ligação com a bactéria presente no meio contaminante. Compostos orgânicos com um grupo tiol em uma das extremidades e a outra terminação da cadeia composta por ácido carboxílico (R-COOH) ou aminas (R-NH₂) podem ser utilizados para a formação da SAM, especialmente para o uso com anticorpos, como a cistamina, a cisteamina e o ácido mercaptopropiônico (HORIKAWA, 2013; SU *et al.*, 2004).

3.4.1 A formação de camadas auto-organizadas

As monocamadas auto-organizadas representam um papel fundamental no desempenho de biossensores devido a sua versatilidade, simplicidade, alta estabilidade e pela capacidade de produzir estruturas ordenadas. São formadas após a imersão de uma superfície sólida ou líquida em uma solução diluída que contém moléculas funcionais. A superfície é colocada em imersão por um determinado tempo especificado, seguido com lavagem em solvente e secagem (FERREIRA *et al.*, 2006, CHAKI *et al.*, 2001, LOVE *et al.*, 2005).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A formação das SAM é compatível com substratos metálicos (prata, ouro, platina, entre outros), possibilitando a aplicação em biossensores. As SAMs permitem flexibilidade no que diz respeito às aplicações, sendo dependentes da sua funcionalidade (hidrofílica ou hidrofóbica) ou da variação do comprimento da cadeia. A monocamada ao longo de uma cadeia de alcanotiol, por exemplo, produz uma membrana na superfície capaz de imobilizar moléculas biológicas (CHAKI *et al.*, 2001; CANCINO, 2008). A formação da monocamada é afetada pela natureza e rugosidade da superfície (Figura 10), pelo solvente utilizado, temperatura, tempo e concentração do composto aplicado. A vacância monoatômica é um dos tipos de defeitos encontrados na superfície de ouro, onde ocorre uma diminuição de átomos de ouro presentes na superfície (MENDES, 2006).

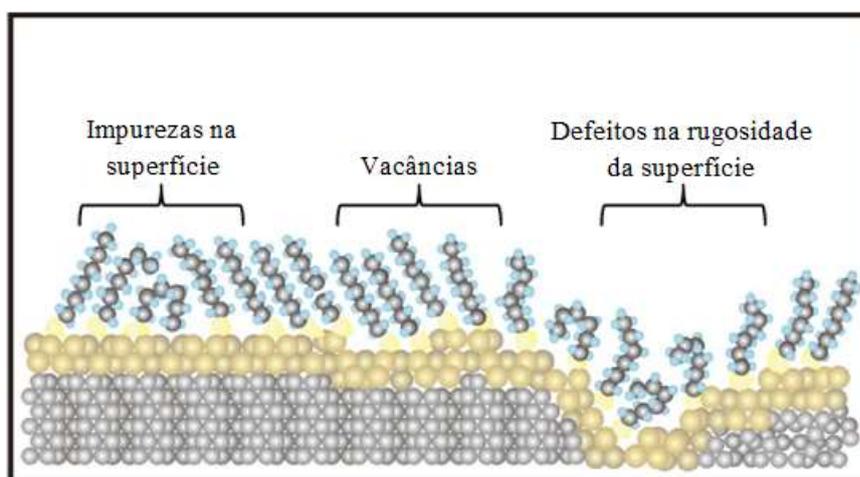


Figura 10. Influência da topografia da superfície na formação de monocamadas auto-organizadas de alcanotióis (CANCINO, 2008).

O etanol é o solvente frequentemente utilizado no preparo e formação da SAM devido ao baixo custo, baixa toxicidade e disponibilidade de obtelo-lo em elevada pureza. A cinética de formação da SAM é favorecida na temperatura de 25 °C, a qual os defeitos de compactação são minimizados. O efeito da temperatura é relevante durante os primeiros minutos de formação das monocamadas, uma vez que é neste período que ocorre a maior parte da adsorção e crescimento (LOVE *et al.*, 2005).

O tempo de aplicação e a concentração do composto orgânico utilizado cooperam com a formação da SAM. Uma vez que estes fatores são inversamente proporcionais, soluções com baixas concentrações de tióis requerem maior tempo de aplicação para a formação das monocamadas (CHAKI *et al.*, 2001; CANCINO, 2008; RANIERI *et al.*, 2009). O substrato de ouro é favorável para a formação de monocamadas auto-organizadas, dado que o Au tem fácil

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

deposição de filmes finos e é um metal relativamente inerte (não oxida em temperaturas inferiores ao seu ponto de fusão). Outros metais com propriedades similares ao Au, como a prata e o paládio, também podem ser aplicados na formação das monocamadas, porém são menos estudados (LOVE *et al.*, 2005).

Além de oferecer vantagens como a flexibilidade e estabilidade química, na superfície funcionalizada com Au há a formação facilitada da SAM através da ligação covalente com o metal e o enxofre (Au-SR), resultando em uma estrutura ordenada e orientada conforme apresentada na Figura 11. A interface metal-enxofre corresponde à região de adsorção, na qual a molécula de enxofre exibe o sítio de adsorção com a superfície funcionalizada pelo substrato metálico. A interface orgânica condiz com a cadeia carbônica responsável pela ligação da interface metal-enxofre para a organização da SAM. O grupo terminal pode ter funcionalidade variável, atribuindo à monocamada funcionalidades específicas, como ser capaz de conectar-se com anticorpos (CHAKI *et al.*, 2001; WINK *et al.*, 1997; LOVE *et al.*, 2005).

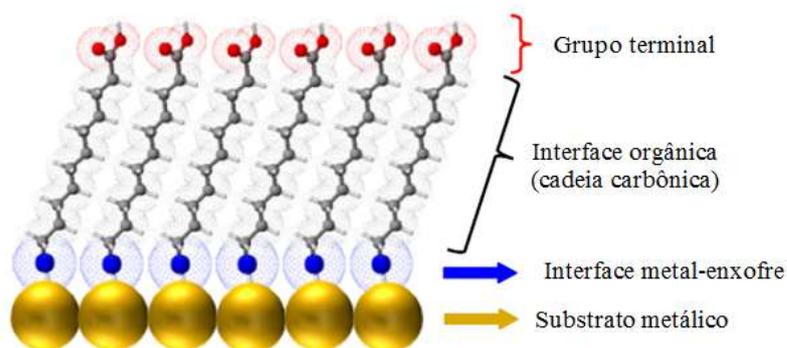


Figura 11. Monocamada auto-organizada em superfície de ouro (COELHO, 2011).

O processo de formação da SAM pela adsorção de tióis em substrato metálico de ouro envolve três etapas: a quebra da ligação S-H, a formação da ligação Au-SR e a liberação para o meio do cátion H^+ , conforme representa a Reação 1 de adsorção. A intensidade energética da ligação entre Au e S é de aproximadamente 40 kcal.mol^{-1} , podendo ser considerada como uma ligação covalente. A energia envolvida na ligação Au-SR torna a SAM de tióis em ouro mais estável em comparação à outras técnicas de obtenção de filmes macromoleculares (CANCINO, 2008; SCHLENOFF *et al.*, 1995; ULMAN, 1996; COELHO, 2011).



3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na etapa inicial de formação da SAM há uma rápida adsorção, seguida pela fase de desenvolvimento e organização dependentes do tempo. Em poucos minutos de aplicação, há um aumento da espessura da monocamada (80-90%) e, posteriormente, este progresso torna-se lento (cerca de horas) para maximizar a compactação das moléculas e minimizar possíveis defeitos na formação da monocamada (Figura 12) (CANCINO, 2008; COELHO, 2011).

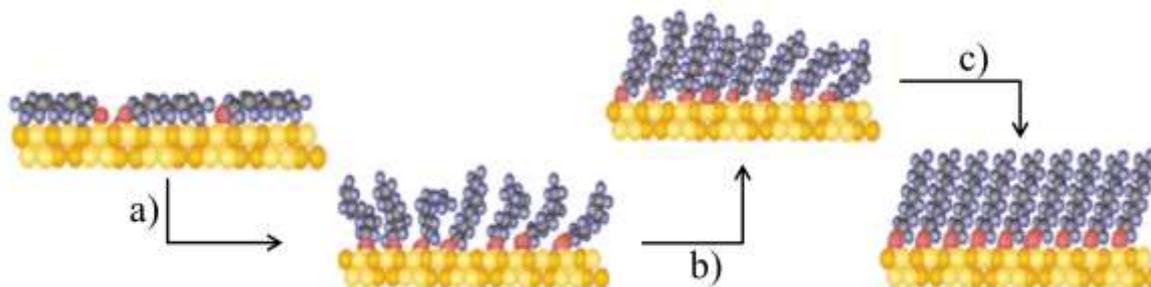


Figura 12. a) etapa de adsorção rápida b) com posterior crescimento lento e c) formação da monocamada auto-organizada (Adaptado de CANCINO, 2008).

3.4.1.1 A formação de camadas auto-organizadas com o uso de cistamina, a cisteamina e ácido mercaptopropiônico

Nos biossensores, as monocamadas com grupos terminais $-NH_2$ e $-COOH$ são amplamente utilizadas para imobilização de biomoléculas. Em geral, as SAMs de cadeia longa fornecem alta cobertura e são mais estáveis termodinamicamente quando comparado à tióis de cadeia curta, devido à diferença na força das interações não covalentes entre as cadeias orgânicas. Em oposição, as monocamadas de cadeia curta facilitam a transferência de elétrons durante a sua formação ocasionando uma maior sensibilidade do biossensor (MENDES, 2006, MOCCELINI, 2001).

A molécula de cistamina ($C_4H_{12}N_2S_2$) é um dissulfeto de cadeia longa que apresenta em sua estrutura dois grupos amina (NH_2) e dois átomos de enxofre (S) em cada uma de suas extremidades, conforme ilustra a Figura 13a (MOSSANHA, 2011). A formação da SAM ocorre através do rompimento da ligação entre os átomos de enxofre, conforme apresenta a Figura 13b.

Em caso particular, a cistamina origina dois tióis, dado que a quebra da ligação S-S libera dois átomos de enxofre para a ligação com o Au, favorecendo assim um acoplamento mais próximo de cada molécula em relação a outros tipos de SAM (MOSSANHA, 2011; GALLI, 2009; WIRDE e GELIUS, 1999; MENDES, 2006).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

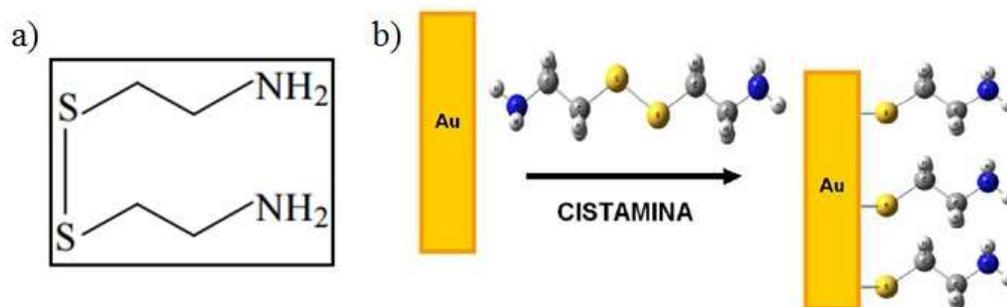


Figura 13. a) estrutura química da cistamina (GALLI, 2009) e b) formação da SAM em superfície de Au com o uso de cistamina (MOSSANHA, 2011).

A cisteamina (C₂H₇NS) é um tiol com estrutura semelhante à cistamina, porém apresenta um átomo de enxofre e um grupo amina em cada uma das extremidades da cadeia, sendo de cadeia curta, conforme ilustra a Figura 14a. Do mesmo modo que a cistamina, a formação da SAM ocorre pela quebra da ligação com o enxofre e adsorve sobre a superfície de ouro, conforme apresenta a Figura 14b (MENDES, 2006).

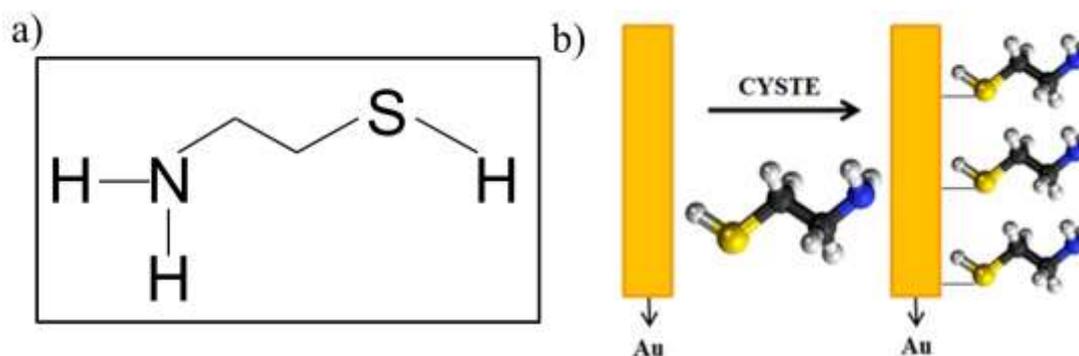


Figura 14. a) estrutura química da cisteamina (Adaptado de MENDES, 2006) e b) formação da SAM em superfície de Au com o uso de cisteamina (Adaptado de MOSSANHA, 2011).

A molécula de ácido mercaptopropiônico (HSCH₂CH₂COOH) também é um tiol de cadeia curta (possui somente três átomos de carbono em sua estrutura) com um átomo de enxofre (S) e um grupo carboxílico (COOH) na sua extremidade, conforme apresenta a Figura 15a (NETO, 2012; MOSSANHA, 2011). Para haver a formação da SAM, o MPA rompe a ligação S-H, quando imobilizado na superfície de Au, conforme ilustra a Figura 15b, permitindo a obtenção de uma monocamada organizada e orientada (MOSSANHA, 2011).

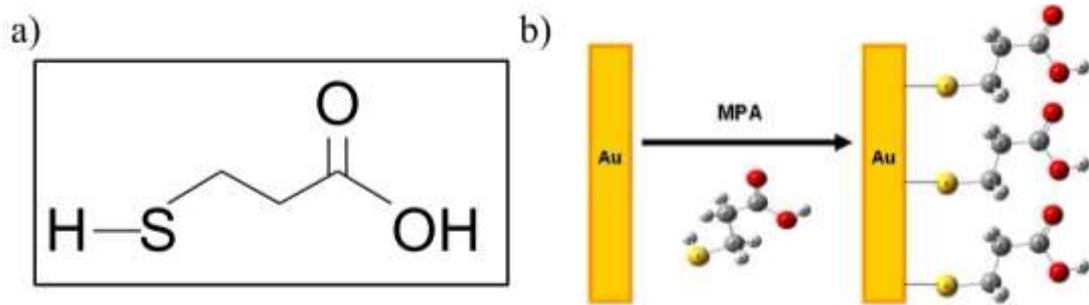


Figura 15. a) estrutura química do ácido mercaptopropiônico (NETO, 2012) e b) formação da SAM em superfície de Au com o uso de ácido mercaptopropiônico (MOSSANHA, 2011).

3.4.2 Anticorpos como elemento de bioreconhecimento

Os anticorpos (Ac) são proteínas reativas encontradas em todos os tecidos e no plasma, pertencentes a classe das globulinas, chamadas imunoglobulinas (Ig), devido a sua estrutura globular. Estas proteínas possuem alto grau de afinidade e especificidade, com capacidade para localizar, detectar, reconhecer e ligar-se ao patógeno alvo. Produzidos pelos linfócitos-B, atuam na defesa do organismo através do sistema imunológico. O anticorpo é combinado com a mesma estrutura do antígeno (molécula alvo), formando uma ligação específica entre ambos (ligação antígeno-anticorpo). A estrutura do anticorpo consiste em quatro cadeias polipeptídicas, com geometria em forma de “Y”: duas leves (L) e duas pesadas (H), conectadas entre si por ligações bissulfídicas, conforme ilustra a Figura 16 (HOPKINS, 2009; MANDAL, 2012; FIALHO, 2011).

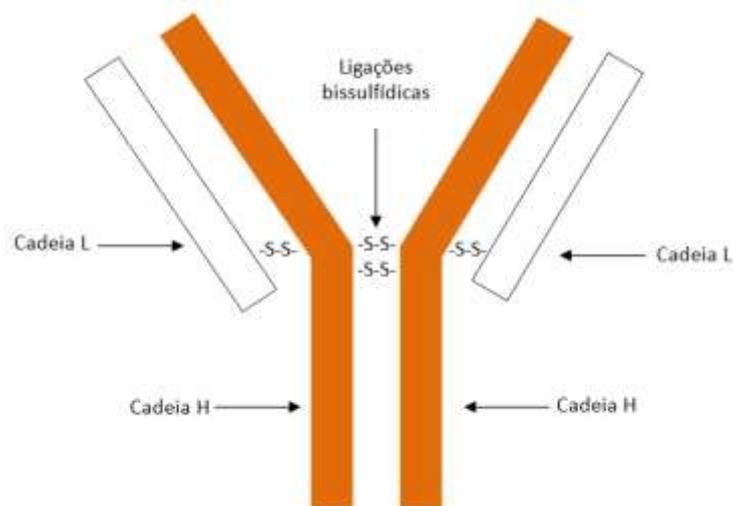


Figura 16. Representação da estrutura básica do anticorpo (BENJAMINI, 2002).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As imunoglobulinas possuem duas regiões principais de ligação: a porção Fab (fragmento de ligação ao antígeno – do inglês, *fragment antigen binding*) e a porção Fc (fragmento cristalizável) (Figura 17). A região Fab corresponde à região de ligação ao antígeno e a região Fc é capaz de formar ligações com vários tipos de estrutura, inclusive a grupamentos amina, carboxil e sulfidril (BENJAMINI, 2002; FIALHO, 2011; MIRANDA, 2014).

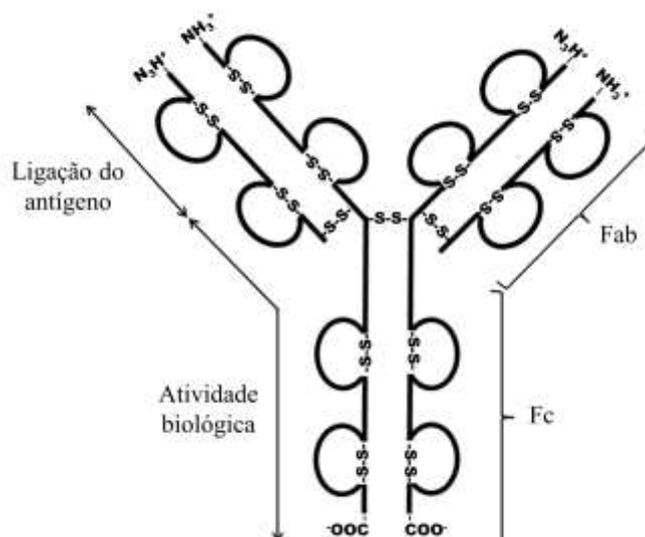


Figura 17. Representação da estrutura básica do anticorpo (Adaptado de BENJAMINI, 2002).

3.4.2.1 Acoplamento de anticorpos na superfície modificada com tióis

Compostos ligantes conhecidos como agentes de reticulação (*crosslinking*) são utilizados para ligação das moléculas de anticorpo sobre a superfície do sensor modificada quimicamente por monocamadas auto-organizadas. Estes compostos tem facilidade de reagir com grupos funcionais desejados de um anticorpo, criando intermediários altamente reativos que proporcionam a ligação com os grupos funcionais da superfície.

A cistamina e a cisteamina podem ser utilizadas para criar grupos sulfidril em proteínas (anticorpos), através da conjugação de um dos seus grupos amino terminais com os carboxilatos (COO⁻) da proteína utilizando uma reação carbodiimida como agente de reticulação. As carbodiimidas são utilizadas para mediar a formação de ligações amida por meio da interação de grupamentos carboxilatos ou fosfatos com uma amina. O dicitloexilcarbodiimida (DCC) e o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) são carbodiimidas utilizadas para esta finalidade. O EDC é comumente utilizado, uma vez que

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

reage rapidamente com carboxilatos para formar um éster ativo intermediário (O-Acylisourea) que reage com um nucleófilo, como uma amina primária, para a formação da ligação amida (Figura 18). A reação pode ocorrer em pH de 4,7 a 7,5 com o uso de uma variedade de soluções tampões (HARMANSON, 2008a).

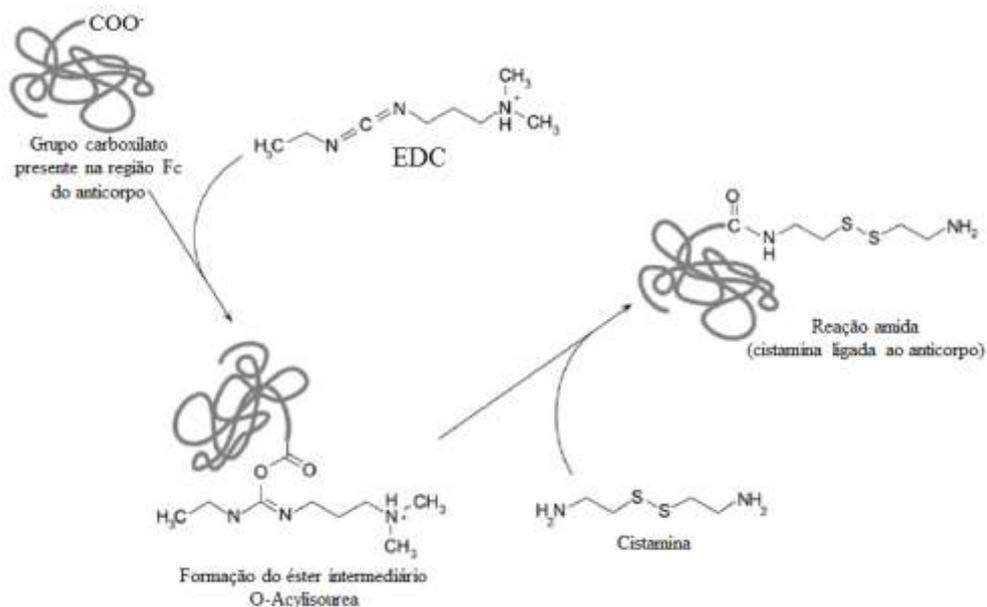


Figura 18. Reação entre o anticorpo e a cistamina intermediada por carbodiimida (HARMANSON,2008a).

O ácido mercaptopropiônico utiliza o EDC e o Sulfo-NHS (N-Hidroxisulfosuccinimida) como agente de reticulação para ativação do grupo terminal carboxílico (-COOH) presente na estrutura deste composto, conforme ilustra a Figura 19.

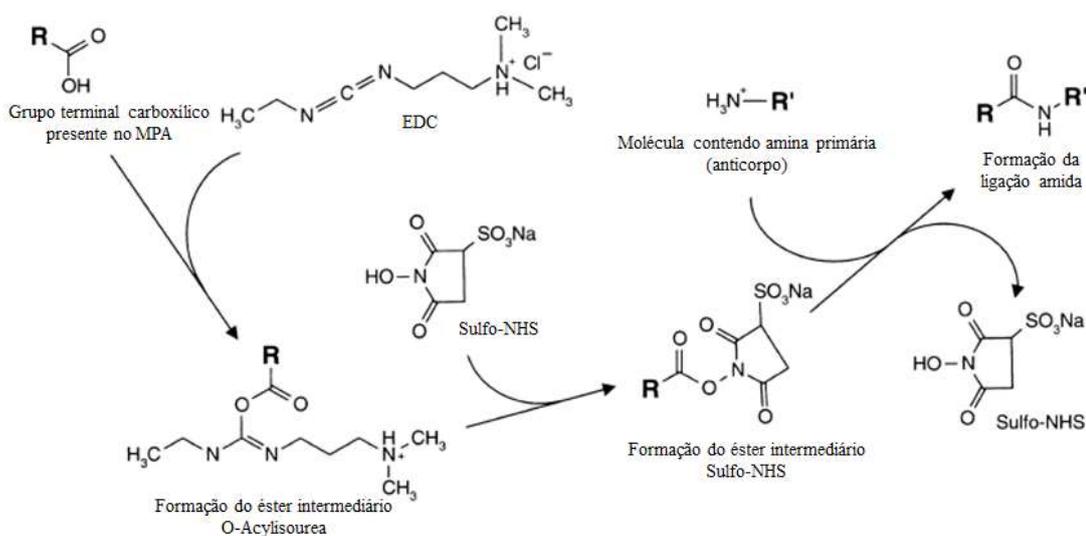


Figura 19. Conjugação de MPA e anticorpo intermediada por EDC e Sulfo-NHS (HARMANSON, 2008b).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Sulfo-NHS por meio de formação de seu intermediário (éster), que apresenta maior estabilidade frente ao formado pelo EDC, ao interagir com o grupamento amina presente no anticorpo, promove a formação da ligação amida pela conjugação (Figura 20).

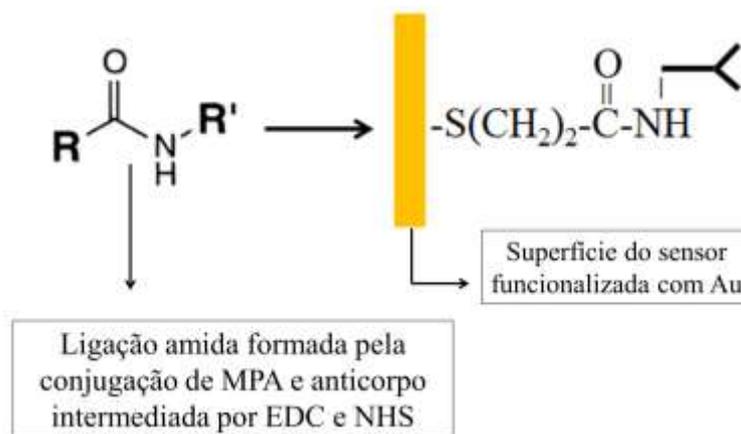


Figura 20. Superfície do sensor com MPA e anticorpo conjugado (Adaptado de FUNG e WONG, 2001).

A formação da ligação amida ocorre via formação do intermediário reativo instável, o O-Acylisourea da molécula de EDC e o grupamento carboxilato. A vantagem da adição de Sulfo-NHS para reações com EDC é a de aumentar a solubilidade e estabilidade do produto intermediário ativo (HARMANSON, 2008b, BRAIEK *et al.*, 2012, JÚNIOR, 2010).

3.5 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS

O desenvolvimento de técnicas de microscopia de varredura por sonda, como a microscopia de força atômica consiste em uma poderosa ferramenta no estudo da organização estrutural das monocamadas auto-organizadas. Uma vez que a formação da SAM e posterior ligação com o anticorpo específico do patógeno-alvo é fortemente afetada pela rugosidade da superfície, a técnica de AFM desempenha um importante papel na quantificação deste parâmetro (LOVE *et al.*, 2005; NETO *et al.*, 2007).

3.5.1 A AFM para análise da superfície dos sensores magnetoelásticos

A AFM fornece imagens da topografia da superfície, em escala nanométrica, movendo mecanicamente a sonda pela amostra e utiliza interações de Van der Waals para estudar as propriedades da superfície (HENKE *et al.*, 2001; RAITERI *et al.*, 2001). Inventada em 1986 por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christopher Gerber (SANTOLIN, 2009), a AFM baseia-se na

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

varredura da superfície estudada por meio de uma ponteira (triangular ou retangular) de dimensões muito reduzidas, aproximadamente 100 a 200 μm de comprimento e menos que 20 nm de diâmetro, integrada em um *cantilever* flexível, formando uma sonda (Figura 21). A AFM proporciona a visualização de superfícies em nível atômico de diferentes naturezas (metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas entre outros) e em diversos meios como vácuo, pressão atmosférica e meios líquidos (FERREIRA *et al.*, 2006).

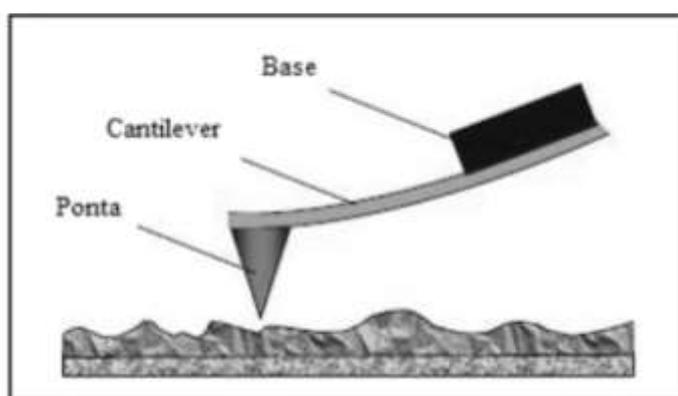


Figura 21. Representação de uma sonda de AFM (SANTOLIN, 2009).

A amostra é fixada em um disco metálico e colocada sobre uma base de cerâmica piezoelétrica, fixada por um ímã. A sonda aproxima-se da amostra, a base de cerâmica piezoelétrica movimenta a amostra, mantendo a força de interação constante e a análise da morfologia da superfície é dada pelo deslocamento vertical do *cantilever*.

A sonda varre a amostra (ou a amostra é deslocada sob a sonda) e os diferentes acidentes topográficos encontrados na superfície provocam variações na interação que acarretam em diferentes deflexões. Os movimentos são identificados por um sensor no qual é refletido um feixe de *laser* e um controlador, conectado à um computador que processa as informações gerando as imagens (BRUSHAN *et al.*, 2011, TANG *et al.*, 2004). Dentre as vantagens de utilização desta técnica, destacam-se a praticidade e versatilidade do equipamento, uma vez que as amostras necessitam de pouco ou nenhum preparo (COSTA, 2010).

O equipamento pode ser operado em três diferentes modos: contato, não-contato e contato intermitente. A Figura 22 ilustra a relação entre a força de interação e a distância ponta-amostra para os três modos de operação.

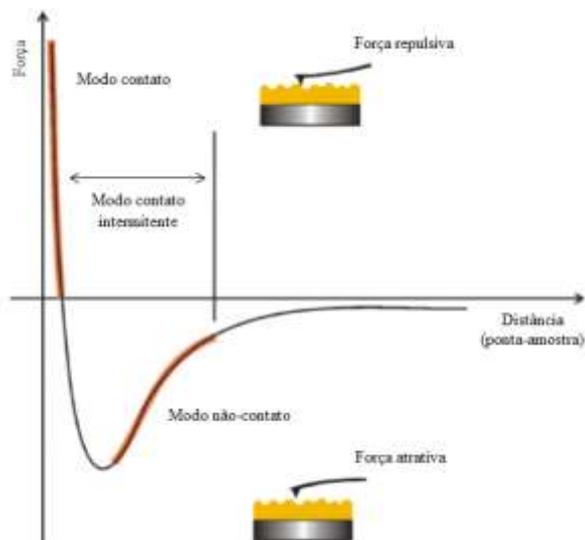


Figura 22. Relação entre a força de interação e a distância ponta-amostra para os modos de operação do AFM (COSTA, 2010).

No modo contato a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva e o *cantilever* é mantido a poucos Ângstroms de distância entre a superfície e a amostra. A constante de força do *cantilever* determina a força aplicada sobre a amostra favorecendo a obtenção de imagens de alta resolução em superfícies lisas e rígidas. A compressão entre a ponta e amostra e as forças geradas podem causar dificuldades no movimento da ponta, gerando danos à superfície, principalmente em amostras maleáveis, devendo ser evitado em amostras biológicas e orgânicas.

No modo não-contato a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa e o *cantilever* é mantido de dezenas a centenas de Ângstroms de distância entre a superfície e a amostra. Neste modo, a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 400 kHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa (10^{-12} N ou inferior em líquidos e 10^{-7} N em ar). A ponta é sensível a forças, como interações de Van der Waals, durante as oscilações e o efeito dessas forças sobre a amostra pode ser utilizado para obter informações sobre a topografia da superfície. Este modo não tem aplicabilidade geral devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande.

O modo intermitente, também chamado de semi-contato ou *tapping*, possui características intermediárias entre os outros dois modos. Neste, a ponta fica mais próxima da amostra, de maneira que tenha-se um contato intermitente, utilizado para contornar as limitações impostas pelos outros modos. A oscilação do *cantilever* é próxima da frequência de ressonância, podendo ser aplicado na análise de materiais mais maleáveis como materiais

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

biológicos, polímeros e em amostras muito rugosas (ZAVALA, 2008; TANG *et al.*, 2004; ALMEIDA, 2010).

Celédon *et al* (2006) utilizaram imagens de AFM com diferentes ampliações (2500 nm^2 , 1000 nm^2 e 250 nm^2) para determinar a rugosidade de filmes de ouro depositados pelo método de *sputtering* sob diferentes condições. Ayoub e Beaulieu (2013) utilizaram a técnica para avaliar a morfologia de filmes de ouro depositados sobre silício. Vários autores também estudam o parâmetro de rugosidade de SAM depositada em ouro através da técnica de AFM. Briand *et al* (2007) investigaram a formação de SAM de ácido 1-mercapto-11-decanóico, ácido 1-mercapto-6-hexanol e cistamina sobre o ouro e também a imobilização de proteína A sobre as SAM estudadas, comparando os dados de rugosidade obtidos para as duas situações.

A ponta do AFM pode ser modificada quimicamente, a fim de torna-la sensível à interações moleculares específicas. Esta técnica é chamada de Microscopia de Força Química (CFM – *Chemical Force Microscopy*) e pode ser utilizada para investigar forças entre grupos moleculares distintos e mapear a distribuição de grupos funcionais específicos. A ponta é capaz de gerar contraste dependente das propriedades químicas da amostra, através do sinal de fase (modo *tapping*), indicando a adesão entre a ponta e a amostra e podendo ser medido simultaneamente com a topografia (MOREAU, 2005).

Através da CFM é possível mapear a informação química da superfície e quantificar as forças adesivas ou repulsivas associadas a materiais inorgânicos e biológicos da superfície, através do controle de interações químicas entre a ponta e a amostra. O método de monocamadas auto-organizadas é amplamente utilizado para funcionalizar pontas e superfícies (Figura 23) (STEFFENS *et al*, 2012; TANG *et al.*, 2004).

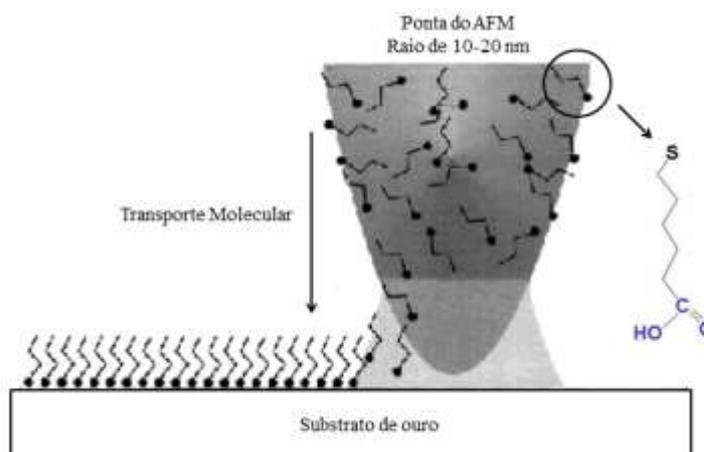


Figura 23. Ponta de AFM modificada quimicamente com uma monocamada auto-organizada (Adaptado de TANG *et al.*, 2004).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A SAM é formada pela imersão da ponta do AFM em uma solução contendo moléculas funcionais em um tempo específico. Com a ponta revestida, uma molécula química pode ser depositada sobre a superfície da amostra durante a varredura, formando nanoestruturas químicas sobre a superfície. Interações específicas entre antígeno e anticorpo também podem ser analisadas pela técnica (STEFFENS *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2004, OUERGI *et al.*, 2002).

A perspectiva neste trabalho é que a técnica de AFM possa fornecer imagens topográficas das superfícies analisadas, sendo possível a obtenção e avaliação de parâmetros de rugosidade. Espera-se que a investigação da superfície modificada com os diferentes tióis empregados informe características da deposição destes compostos relevantes à homogeneidade e dispersão. Deseja-se também que a espécie patogênica conectada ao anticorpo específico ocasione uma alteração da massa na superfície do biossensor e, conseqüentemente, a variação na frequência de ressonância, sugerindo a captação e detecção do microrganismo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A liga amorfa magnetoelástica funcionalizada com Au e o processamento do sensor magnetoelástico por micro serra, proporcionam a dimensão adequada e consistem nas partes iniciais para a montagem do biossensor. A deposição dos diferentes tióis empregados (CYS, MPA e CYSTE) remetendo a formação de elementos bioconjugados com o uso de anticorpos é primordial para a ligação com o patógeno alvo. As análises de frequência de ressonância fornecidas pelo analisador de rede são realizadas para a verificação do comportamento e desempenho do biossensor magnetoelástico.

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1 Liga amorfa magnetoelástica

A liga amorfa magnetoelástica 2823MB3 foi adquirida pela empresa americana Metglas Company. Disposta na forma de bobinas, apresenta 30 μm de espessura e largura de 2 polegadas (METGLAS, 2011). Para melhorar a sensibilidade, a fita foi polida, até a espessura de 15 μm , a fim de tornar a superfície plana e uniforme, conforme a metodologia descrita por Possan (2015).



Figura 24. Liga amorfa magnetoelástica Metglas 2826MB3.

4.1.2 Reagentes, vidrarias e equipamentos

Os reagentes e vidrarias utilizados nos experimentos foram disponibilizados pelo Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA (LGPRD) situado no Instituto de

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Biotecnologia (IB) da Universidade de Caxias do Sul (UCS), conforme descreve o Anexo I – Quadro 1. Os equipamentos utilizados nos ensaios foram disponibilizados pelo LGPRD e pelo Laboratório de Caracterização Magnética (LCM) da UCS, conforme descreve o Anexo I – Quadro 2.

4.1.3 Microrganismo

A contaminação de biossensores foi realizada com a cepa de *Escherichia coli* O6 biotype 1 (*Migula*) *Castellani and Chalmers* ATCC25922. Esta cepa foi mantida congelada a temperatura de -20 °C em solução de leite em pó 20 % m/m.

4.1.4 Meio de cultura

Selecionou-se o meio de cultura Luria Bertami para o crescimento de *E. coli* utilizada nos ensaios. As diluições e o processo de esterilização seguem em acordo com Sezonov *et al.* (2007). A composição dos meios sólido e líquido utilizados está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Meios de cultura sólido e líquido para crescimento de *Escherichia coli* (SEZONOV *et al.*, 2007).

	Meio sólido (% m/v)	Meio líquido (% m/v)
Triptona	1,5%	1,5%
Peptona	0,5%	0,5%
NaCl	0,05%	0,05%
Ágar	1,5%	-
Água destilada	Até 100%	Até 100%

4.1.5 Anticorpos

Os anticorpos primário Anti-*E. coli* ab137967 (4,5 mg.mL⁻¹) e secundário Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 (2 mg.mL⁻¹) foram adquiridos pela ABCAM fracionados e mantidos sob refrigeração a temperatura -20 °C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS

4.2.1 Análises microscópicas dos biossensores magnetoelásticos

As análises de AFM foram realizadas em *Scanning Probe Microscopy* SPM 9700 da Shimadzu no modo *tapping* e os parâmetros de funcionamento foram ajustados para efetuar a varredura em uma área de $1 \mu\text{m}^2$ e $10 \mu\text{m}^2$ (AYOUB e BEAULIEU, 2013, CELEDON *et al.*, 2006, BRIAND *et al.*, 2007, OUERGHI *et al.*, 2002). Utilizou-se ponteiros de silício NCHR-10. Os dados coletados são interpretados pelos parâmetros de rugosidade média absoluta (Ra), do desvio padrão da distribuição das alturas da superfície (Rq) e da assimetria do perfil de distribuição (Rsk) e foram obtidos através das imagens com área de $1 \mu\text{m}^2$ pelo *software* do equipamento. Os valores obtidos condizem com a média aritmética de três imagens em diferentes locais de varredura.

O parâmetro Ra informa uma descrição geral das variações de altura da amostra e é definido como a rugosidade média absoluta medida a partir da linha média ao longo do comprimento da superfície, conforme ilustra a Figura 25. A definição matemática para este parâmetro é dada pela Equação 6, onde n representa o número de intersecções do perfil até a linha média (GADELMAWLA *et al.*, 2002).

$$Ra = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (6)$$

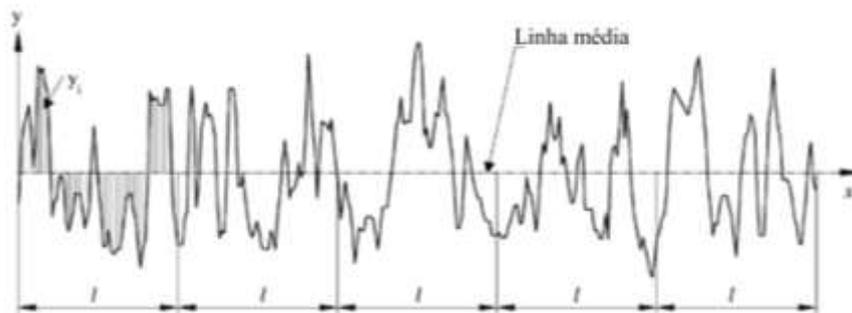


Figura 25. Representação gráfica do parâmetro de rugosidade média absoluta (Ra) (Adaptado de GADELMAWLA *et al.*, 2002).

O parâmetro Rq, também conhecido como RMS (*root mean square*), é a linha que divide o perfil de modo que a soma dos quadrados da altura seja igual a zero. Este parâmetro

4 MATERIAIS E MÉTODOS

representa o desvio padrão das alturas da superfície e é definido pela Equação 7 (GADELMAWLA *et al.*, 2002).

$$Rq = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y^2|} \quad (7)$$

O parâmetro Rsk é sensível à vales profundos ou picos altos e utilizado para medir a assimetria do perfil a partir da linha média, definido matematicamente pela Equação 8, onde N corresponde ao número de pontos. Uma distribuição simétrica de picos e vales possui Rsk = 0. Perfis com picos removidos ou vales profundos apresentam valor de Rsk negativo (Figura 26a) e perfis com vales preenchidos ou picos altos possuem Rsk positivo (Figura 26b) (GADELMAWLA *et al.*, 2002).

$$Rsk = \frac{1}{NRq^3} \left(\sum_{i=1}^N y^3 \right) \quad (8)$$

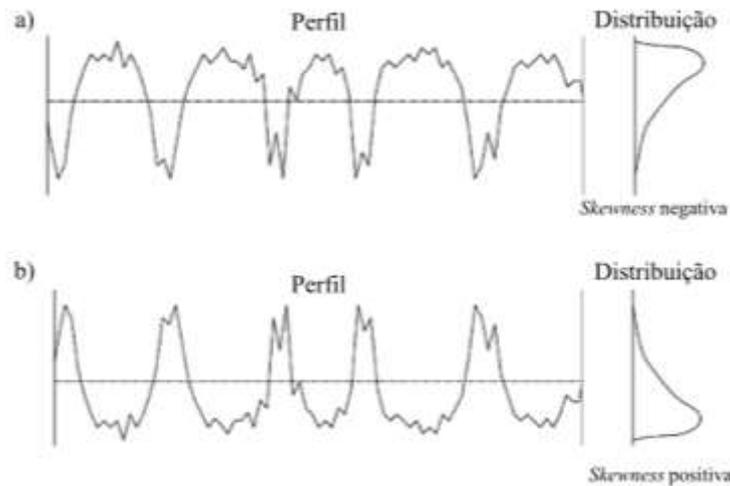


Figura 26. Representação gráfica do parâmetro de assimetria de distribuição das alturas da superfície a) para superfície com Rsk negativa e b) para superfície com Rsk positiva (Adaptado de GADELMAWLA *et al.*, 2002).

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas por *Scanning Electron Microscopy* da TESCAN modelo MIRA 3. A microscopia de fluorescência, utilizada para verificar a interação entre a bactéria e o anticorpo, foi realizada em microscópio de

4 MATERIAIS E MÉTODOS

fluorescência Olympus BX3/BX53 para emissão de 488 nm (Filtro 2) e as imagens registradas pelo *software Cellsens*.

4.2.2 Análises das frequências de ressonância

A análise das frequências de ressonância dos biossensores foi realizada pelo analisador de redes E5061B HP/Agilent. O equipamento apresenta gráficos de frequência de ressonância com marcadores pré-dispostos para informar os valores específicos de picos de ressonância. Os valores são obtidos do analisador de rede e ordenados em planilhas para utilização no *Microsoft Office Excel*.

4.2.3 Crescimento e contagem das bactérias

A bactéria *E. coli* foi transferida para uma placa de Petri com o meio LB sólido a partir da amostra original. Decorrido o tempo de crescimento (± 20 h em estufa à 37 °C), uma unidade formadora de colônia foi utilizada para inoculação e posterior crescimento em 100 mL de meio LB líquido nas mesmas condições, com agitação de 100 rpm, proporcionando o caldo de bactérias para iniciar a diluição seriada (GUIA DE MICROBIOLOGIA, 2015).

A diluição seriada foi realizada com solução tampão PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,4 a partir do concentrado de bactérias. Iniciou-se com 0,9 mL de solução de PBS e 0,1 mL de solução de bactérias, até a escala 1.10^{-6} permitindo a contagem das unidades formadoras de colônia em meio semissólido. Para cada análise foram feitas novas suspensões de bactérias e a concentração foi determinada a partir da média da contagem de UFC de três placas. A contaminação nos biossensores se deu com solução de *E. coli* concentrada em 10^9 UFC.mL⁻¹ para os três tióis analisados.

4.3 METODOLOGIA

A Figura 27 representa o fluxograma da metodologia utilizada no processo de elaboração dos biossensores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

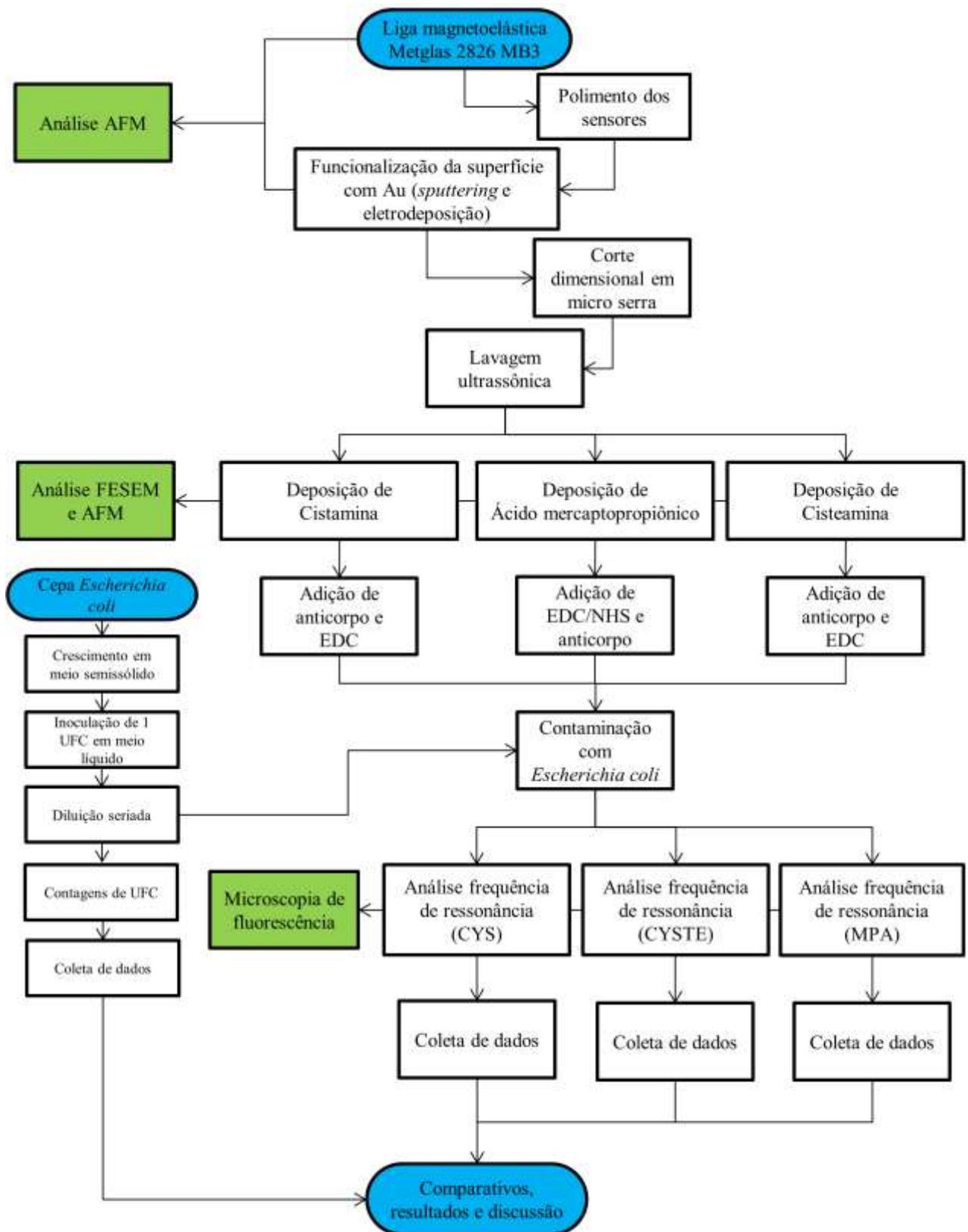


Figura 27. Fluxograma do procedimento experimental para elaboração dos biossensores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Funcionalização da superfície do sensor magnetoelástico

O processo de *sputtering* foi realizado pelo grupo de pesquisa do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP) em cooperação com o professor Antônio Domingues dos Santos. O processo de deposição de Au por eletrodeposição foi realizado com ânodo de aço inox 304, 8-10 V; 2 A.dcm⁻², tempo de 2 minutos, pH 11 e volume de eletrólito de 150 L pela empresa Celvi Revestimentos Galvanotécnicos.

4.3.2 Dimensionamento da fita magnetoelástica

A fita utilizada na análise de detecção da bactéria *E. coli* foi dimensionada de forma que possua boa sensibilidade e possibilidade de manuseio. O tamanho utilizado foi de 5 mm de largura e 1 mm de altura. Após a deposição de Au, a fita amorfa foi processada com serra *microdicing saw* em cooperação com o Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) em Campinas – SP.

4.3.3 Aplicações de tióis com soluções de cistamina, cisteamina e ácido mercaptopropiônico sobre os biossensores magnetoelásticos

Após a deposição de Au e o processamento de corte, os sensores foram lavados em ultrassom com solução de Etanol/Metanol 1:1 estando prontos para a deposição dos tióis na superfície. A deposição de cada composto estudado (CYS, MPA e CYSTE) foi feita em meio líquido com etanol na concentração de 20 mM pelo tempo de 24 horas sob agitação de aproximadamente 1700 rpm em temperatura ambiente (23 °C ±2 °C). Após a deposição, o sensor foi lavado com o meio diluente para remover moléculas não ligantes e transferido para um micro tubo de reação de 250 µL (*Eppendorf*) (BALL *et al*, 2003; POSSAN *et al.*, 2016).

4.3.4 Aplicação de anticorpo sobre a superfície do biossensor magnetoelástico modificada com os compostos tióis

O anticorpo primário Anti-*E. coli* ab137967 foi diluído para a concentração de 0,02 mg.mL⁻¹ com PBS (pH 7,4). Nos sensores com cistamina e cisteamina foi adicionado EDC 20 mM em proporção 1:100 com o anticorpo e incubado por 2 horas na temperatura de 37 °C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nos sensores com ácido mercaptopropiônico foi adicionado EDC 15 mM e Sulfo-NHS 35 mM pelo tempo de 2 horas em temperatura ambiente e posterior adição do anticorpo diluído por 2 horas à 37 °C. Após a aplicação do anticorpo, o biossensor foi lavado com PBS (pH 7,4) a fim de remover ligações não específicas. Para a análise em microscopia de fluorescência, o anticorpo secundário foi diluído para a concentração de 0,008 mg.mL⁻¹ com PBS (pH 7,4) (HARMANSON, 2008a,b; BALL *et al*, 2003; BRAIEK *et al*, 2012).

4.3.5 Contaminação do biossensor com a cultura de bactérias e análise das frequências de ressonância

Após a aplicação do anticorpo o biossensor foi contaminado com a suspensão de bactérias de concentração conhecida e foram realizadas as leituras de frequência de ressonância. As leituras foram verificadas durante 60 minutos, tomadas em intervalos de 2 minutos (POSSAN, 2015). Ao tempo inicial foi verificado o valor da frequência de ressonância e registrado como valor zero.

Considerando o peso e a dimensão do patógeno utilizado, os valores de variação de frequência verificados foram utilizados para calcular a sensibilidade mássica por bactéria e os limites de detecção dos biossensores, a partir das Equações 3, 4 e 5 descritas na seção 3 deste trabalho.

4.3.6 Estimativa do limite de detecção, eficiência e análise estatística dos biossensores magnetoelásticos

Para estimar o limite de detecção dos biossensores foi considerado o método do desvio padrão da diferença disposto em Skoog, 2014. Este método considera a raiz quadrada da diferença dos quadrados entre o desvio padrão médio do sensor contaminado (S1) e o desvio padrão médio do sensor branco (S2), conforme descreve a Equação 9.

$$S = \sqrt{S1^2 - S2^2} \quad (9)$$

A eficiência dos biossensores foi estimada a partir da variação máxima de frequência de ressonância obtida para um biossensor de tamanho 5 x 1 mm, sendo de 376 Hz,

4 MATERIAIS E MÉTODOS

considerando a variação máxima de frequência de ressonância dos biossensores testados com os diferentes tióis (POSSAN *et al.*, 2016).

A análise de variância (ANOVA) é a metodologia estatística empregada para avaliar a significância dos fatores e interações, permitindo que vários grupos sejam comparados ao mesmo tempo. A análise ANOVA fornece os dados da soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (GL), a média dos quadrados (MQ), o valor $F_{\text{calculado}}$, o valor P e o valor $F_{\text{crítico}}$. Para testar a hipótese referente aos efeitos dos grupos utiliza-se o Teste F, comparando o $F_{\text{calculado}}$ com o $F_{\text{crítico}}$. Se o valor calculado for maior que o crítico existem diferenças significativas entre os grupos provocada pelo fator controlável em estudo. Outra maneira de avaliar as diferenças significativas é através do valor p. Se o valor P for menor ou igual ao nível de significância (α), as diferenças entre os grupos também serão significativas (ANI *et al.*, 2012; VIEIRA, 2006; SKOOG, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS SENSORES MAGNETOELÁSTICOS

As superfícies rugosa, lisa e polida das fitas magnetoelásticas foram cobertas pelo processo de *sputtering* com uma camada de aproximadamente 130 nm de Cr e 115 nm de Au (POSSAN, 2015). A Figura 28 representa a microscopia de força atômica da fita magnetoelástica.

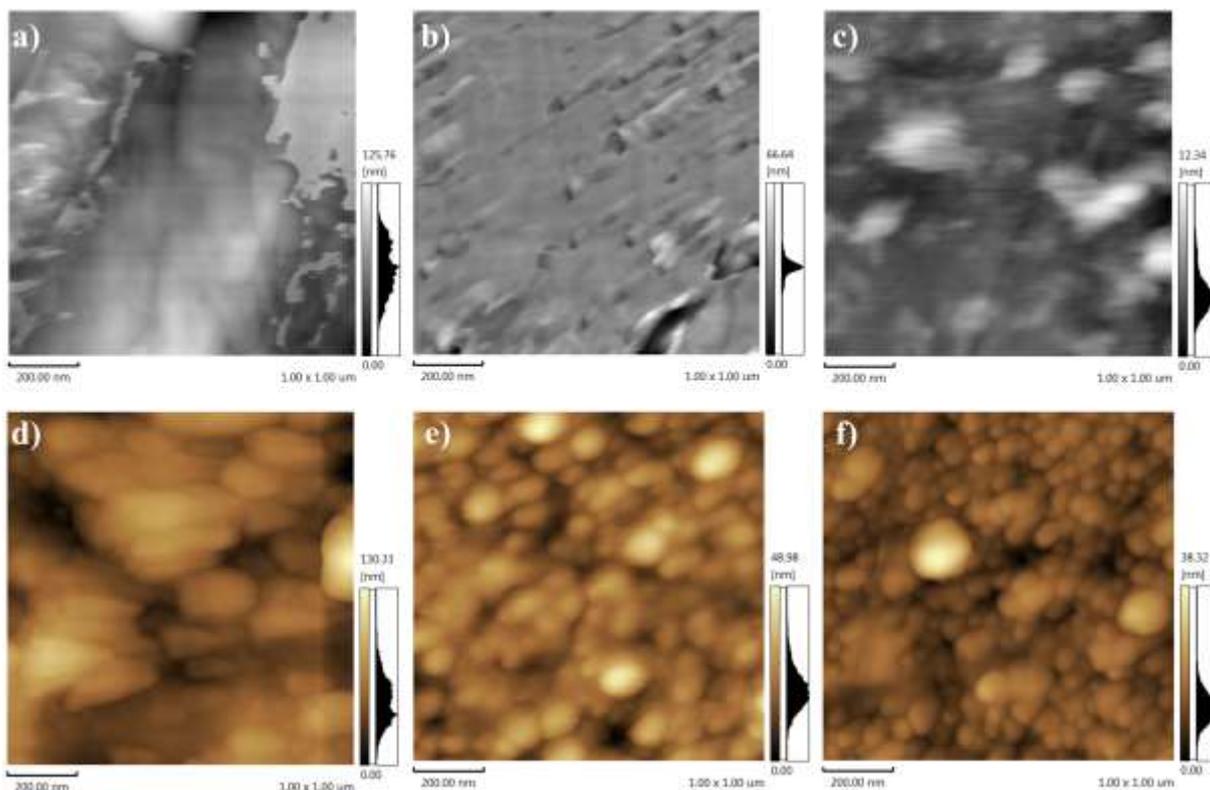


Figura 28. Representação da microscopia de força atômica a) superfície rugosa *as cast* b) superfície lisa *as cast* c) superfície polida *as cast* d) superfície rugosa com recobrimento de Cr/Au por *sputtering* e) superfície lisa com recobrimento de Cr/Au por *sputtering* f) superfície polida com recobrimento de Cr/Au por *sputtering*.

É possível observar que a deposição de Cr e Au na superfície da fita magnetoelástica é caracterizada por grãos de diferentes tamanhos distribuídos na superfície. A Tabela 4 apresenta a análise quantitativa dos parâmetros de rugosidade avaliados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para as superfícies rugosa, lisa e polida *as cast* e com deposição de Cr/Au pelo processo de *sputtering*.

	Superfície <i>as cast</i>			Superfície com deposição de Cr/Au pelo processo de <i>sputtering</i>		
	Rugosa	Lisa	Polida	Rugosa	Lisa	Polida
*Ra (nm)	13,1 ±6,2	2,4 ±0,8	0,9 ±0,2	12,9 ±2,0	4,7 ±0,6	2,8 ±0,1
**Rq (nm)	16,5 ±4,3	3,6 ±1,1	1,1 ±0,6	17,0 ±3,0	5,9 ±1,0	3,5 ±0,1
***Rsk	0,5 ±0,1	-0,6 ±0,1	0,4 ±0,0	0,5 ±0,1	0,6 ±0,0	0,02 ±0,0

*Ra: rugosidade média absoluta

**Rq: desvio padrão das alturas da superfície

***Rsk: assimetria do perfil de distribuição

A altura da superfície foi avaliada nos parâmetros de Ra e Rq. Em todas as superfícies, observa-se que Rq é, em média, 30% maior que Ra corroborando com resultados obtidos por Shindo *et al.* (2013) no estudo da rugosidade por AFM em substrato de mica e silício com deposição de Au por *sputtering*. Verifica-se que a superfície polida apresenta menores valores de Ra e Rq em relação às demais. Possan (2015) estudou a rugosidade de fitas Metglas 2826MB3 com rugosímetro e também observou menor Ra para a superfície polida apontando que a redução da rugosidade é importante para proporcionar uma SAM mais dispersa, resultando em um melhor acoplamento com o anticorpo e, conseqüentemente, uma maior captação de bactérias.

A superfície rugosa apresenta um valor positivo de Rsk, consistente com a presença de picos elevados para fora do plano. A superfície lisa, inicialmente com Rsk negativo, conduz uma superfície com picos largos e vales profundos, porém após a deposição de Cr/Au, este parâmetro torna-se positivo. A superfície polida apresenta topografia com menor diferença entre picos e vales perante as demais, uma vez que possui menor valor de Rsk. Após a deposição de Cr/Au este parâmetro aproxima-se do valor ótimo (zero), com leve deslocamento para a direita. Segundo Celedón *et al.* (2006) filmes com Rsk próximos ao valor zero apontam uma topografia mais simétrica sendo indicados para aplicações tecnológicas, uma vez que os vales e os picos possuem quase a mesma distribuição.

As superfícies lisa e rugosa também foram revestidas com Au pelo processo de eletrodeposição. As imagens de AFM são representadas na Figura 29 e a Tabela 5 contempla a análise quantitativa dos parâmetros de rugosidade avaliados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

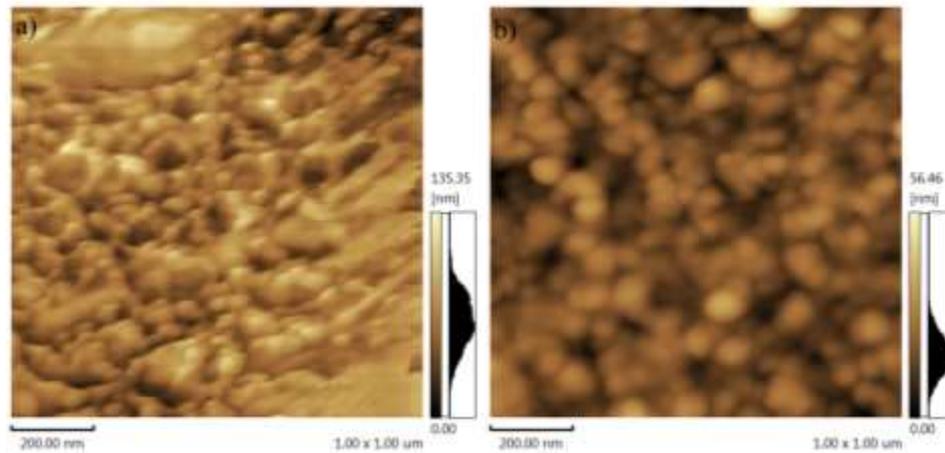


Figura 29. Representação da microscopia de força atômica a) superfície rugosa com recobrimento de Au por eletrodeposição b) superfície lisa com recobrimento de Au por eletrodeposição.

Tabela 5. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para as superfícies rugosa e lisa com deposição de Au pelo processo de eletrodeposição.

	Rugosa	Lisa
*Ra (nm)	12,3 ±1,6	4,4 ±0,3
**Rq (nm)	15,2 ±1,8	5,1 ±0,4
***Rsk	0,9 ±0,0	0,09 ±0,0

*Ra: rugosidade média absoluta

**Rq: desvio padrão das alturas da superfície

***Rsk: assimetria do perfil de distribuição

Como pode ser observado nos dados dispostos na Tabela 5, a deposição de Au por eletrodeposição demonstrou menores valores de Ra e Rq em comparação ao processo de *sputtering*. Através das imagens obtidas, também é possível constatar a distribuição dos aglomerados de Au na superfície da fita magnetoelástica. Relacionando com as imagens das superfícies com deposição de Cr/Au pelo processo de *sputtering*, os aglomerados de ouro aparentam estar mais uniformemente distribuídos. Este fato também pode ser confirmado com a *skewness*, onde a simetria das superfícies revestidas por eletrodeposição é mais uniforme quando comparada às superfícies revestidas por *sputtering*, devido ao Rsk ser menor.

A análise de *Rutherford Backscattering Spectroscopy* (RBS) apontou uma espessura de 123 nm de Au para as fitas revestidas pelo processo de eletrodeposição, conforme ilustra a Figura 30a. Contudo, esta análise apresentou $\pm 20\%$ de orifícios na superfície, provenientes do processo de eletrodeposição, os quais foram confirmados com a microscopia eletrônica de varredura (Figura 30b). Desta forma, estas fitas foram inutilizadas para construção dos

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

biossensores magnetoelásticos, uma vez que uma superfície com orifícios pode comprometer a deposição da monocamada, influenciando no desempenho do biossensor magnetoelástico.

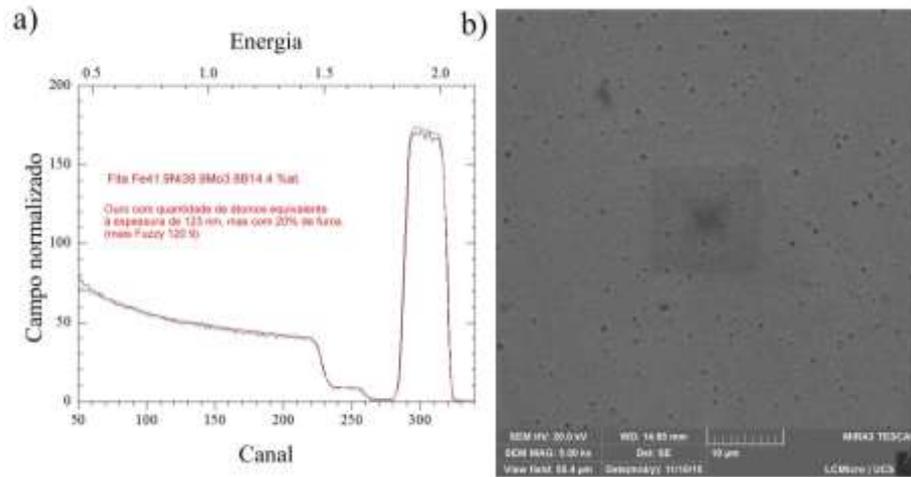


Figura 30. a) espectro RBS do filme de Au depositado por eletrodeposição (Instituto de Física da Universidade de São Paulo – IFUSP) e b) representação da micrografia FESEM comprovando a presença de orifícios na superfície revestida com filme de Au por eletrodeposição.

Após a análise dos parâmetros de rugosidade avaliados, a superfície polida com deposição de Cr/Au por *sputtering* foi escolhida para realizar a construção do biossensor magnetoelástico por possuir menores valores de Ra e Rq e melhor distribuição topográfica ($R_{sk} = 0,02$) em relação às demais superfícies analisadas. A Figura 31 ilustra a micrografia FESEM desta superfície.

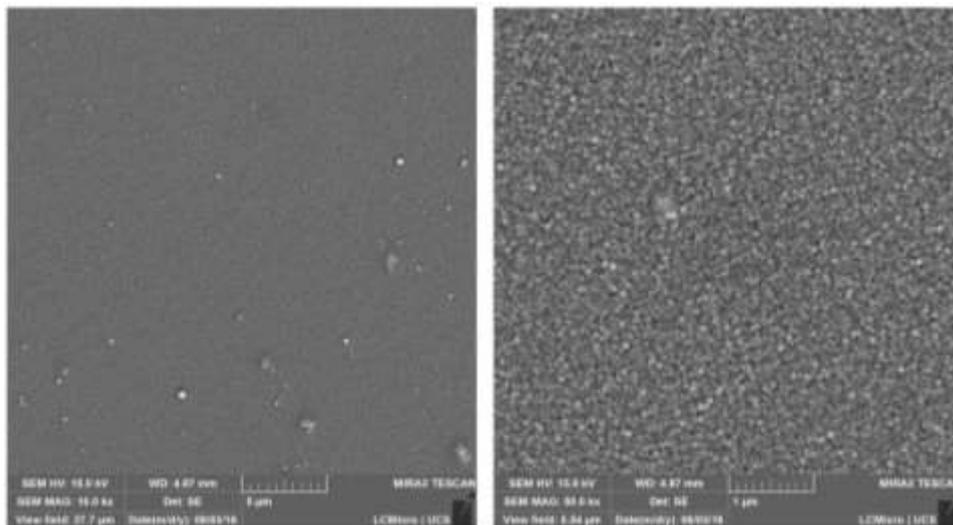


Figura 31. Representação da micrografia FESEM do sensor magnetoelástico de superfície polida revestida com Cr/Au pelo processo de *sputtering* em diferentes magnificações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme já evidenciado na imagem obtida pelo AFM (Figura 26f), o filme de cromo e ouro depositados é caracterizado por grãos arredondados com tamanhos que variam, aproximadamente, de 10 a 200 nm. A morfologia das partículas de ouro varia com o método e com as condições de preparação (FISCHER, 2011).

5.2 CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS

5.2.1 Avaliação da superfície com cistamina, contaminação e análise de frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos

Sobre a superfície polida revestida com Cr/Au pelo processo de *sputtering* foi aplicada uma concentração de 20 mM de CYS para a deposição da SAM. Conforme sugerido por Mossanha (2011), para que ocorra a quebra da ligação entre os átomos de enxofre da molécula de CYS e garantir a formação efetiva e estável da monocamada, o tempo indicado para deposição da SAM sobre a superfície de Au é de 24 h. Decorrido este tempo, a superfície foi analisada em AFM e FESEM, conforme representam as Figuras 32 e 33, respectivamente. A Tabela 6 contempla os dados obtidos da análise quantitativa dos parâmetros de rugosidade avaliados.

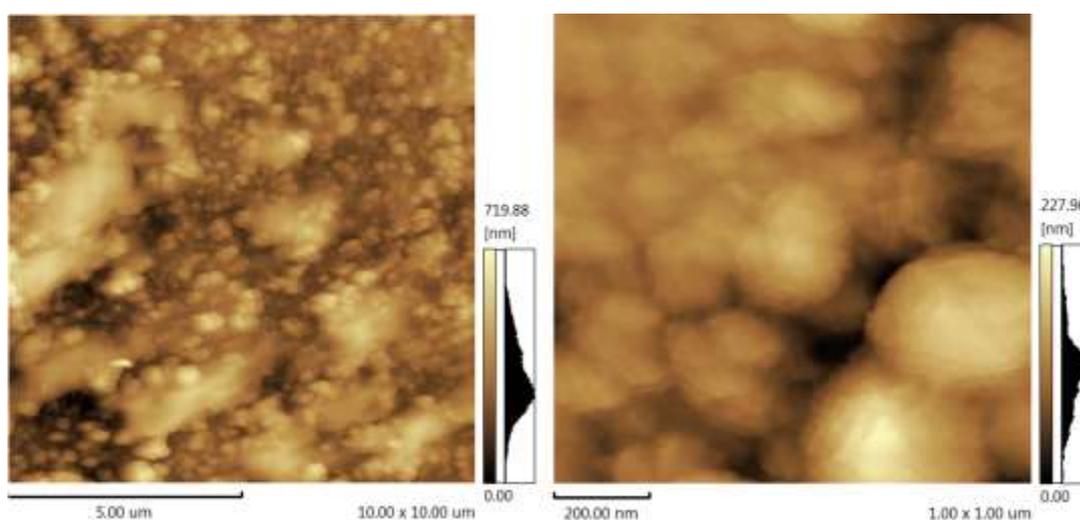


Figura 32. Representação da microscopia de força atômica da superfície do biossensor magnetoelástico com cistamina em diferentes áreas de análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para a deposição de cistamina sobre a superfície de ouro do sensor magnetoelástico.

Parâmetros	Superfície com Au	Superfície com cistamina
*Ra (nm)	2,8 ±0,1	28,6 ±5,7
**Rq (nm)	3,5 ±0,1	33,8 ±4,0
***Rsk	0,02 ±0,0	0,1 ±0,0

*Ra: rugosidade média absoluta

**Rq: desvio padrão das alturas da superfície

***Rsk: assimetria do perfil de distribuição

Observa-se que o biossensor com cistamina apresentou valores de Ra e Rq aproximadamente 10 vezes maiores em relação ao sensor com deposição de Au, evidenciando que a superfície de ouro foi modificada pela monocamada. O parâmetro Rq representa o desvio padrão da distribuição de altura da superfície (GADELMAWLA *et al.*, 2002). Assim, se uma determinada superfície apresentar um perfil com desvios pouco significativos os valores de Rq e de Ra tendem a ser similares. Nos dados dispostos na Tabela 4 observa-se que os valores de Ra e Rq são muito próximos, indicando que a superfície apresenta poucas irregularidades.

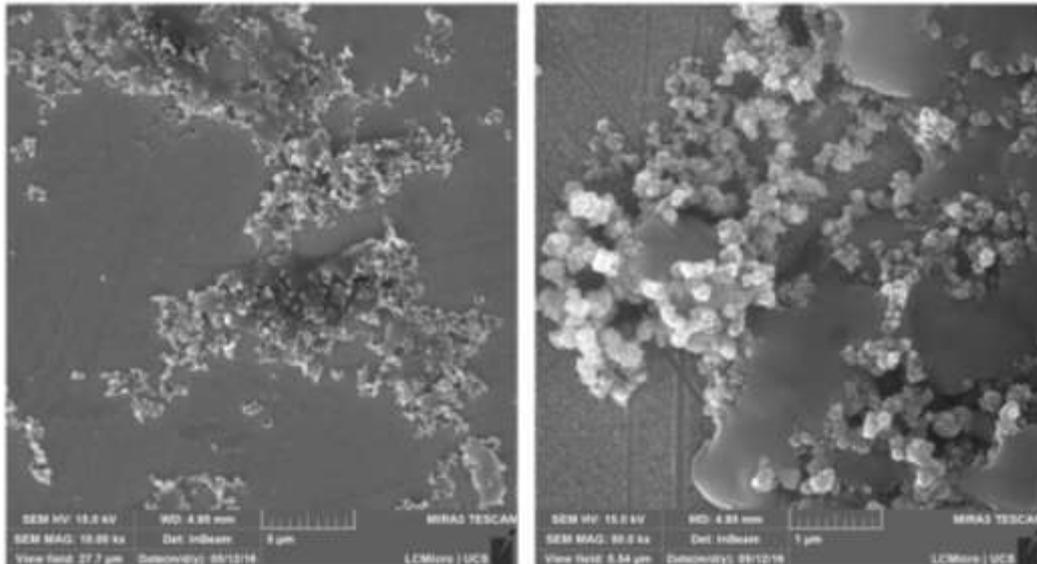


Figura 33. Representação da micrografia FESEM da superfície do biossensor magnetoelástico com cistamina em diferentes magnificações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na micrografia FESEM (Figura 31) é perceptível a presença de uma camada densa e com formação de aglomerados. O fundo do sensor também pode ser observado indicando que não houve uma cobertura total da área disposta. Os riscos associados ao processo de polimento também são visíveis e um melhoramento no processo de tratamento da superfície do sensor magnetoelástico pode melhorar a deposição da SAM durante a sua formação (POSSAN *et al.*, 2016; MENDES, 2006).

Após a deposição de CYS executou-se o protocolo de aplicação de anticorpos, intermediado por EDC e cinco biossensores foram testados sob as mesmas condições. Os dados de Δf coletados, juntamente com o sensor branco, estão ilustrados no gráfico da Figura 34.

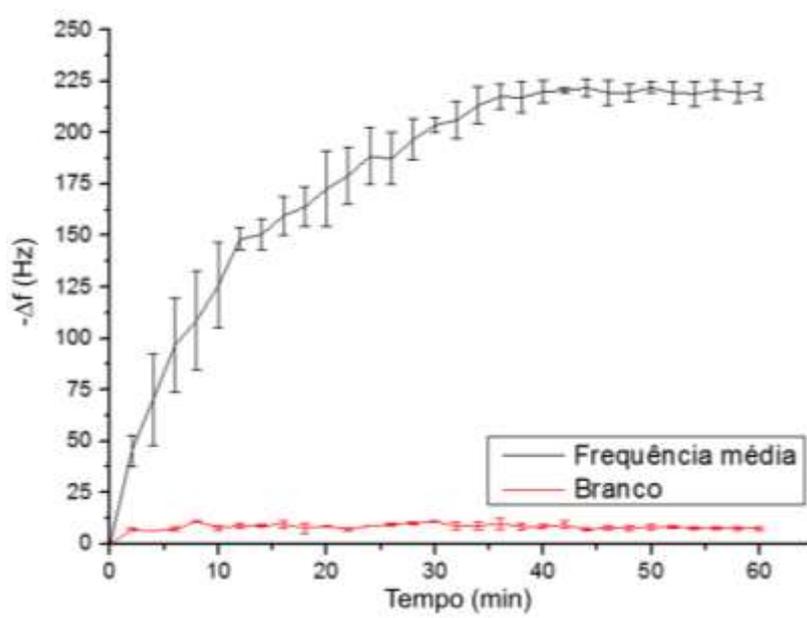


Figura 34. Variação de frequência de ressonância média dos 5 biossensores testados com deposição de cistamina juntamente com o sensor branco.

Os dados obtidos mostram que até 30 minutos há uma alta taxa de captação de bactérias, havendo saturação da superfície do biossensor após este tempo, relacionada às ligações de anticorpos dispostas para as bactérias. A variação máxima (média) de frequência de ressonância foi de 220 Hz. Verificam-se também valores altos de desvio padrão nos tempos iniciais, podendo ser explicado pela disposição de bactérias e variação nas ligações com os anticorpos. O sensor branco é composto somente por cistamina e representa uma variação de frequência de ressonância de 8,2 Hz.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Supondo a massa de uma unidade de bactéria *E. coli* (1×10^{-15} kg), a partir da equação da sensibilidade mássica do biossensor (Equação 3) é possível mensurar, aproximadamente, a sensibilidade por bactéria através da razão destes dois parâmetros. Como proposto por Horikawa (2013), dividindo os valores médios de Δf coletados pela sensibilidade por bactéria, obtém-se as unidades aproximadas de bactérias captadas pela dimensão do biossensor magnetoelástico. Na Figura 35 são contemplados os valores de média de Δf convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão do biossensor em função do tempo.

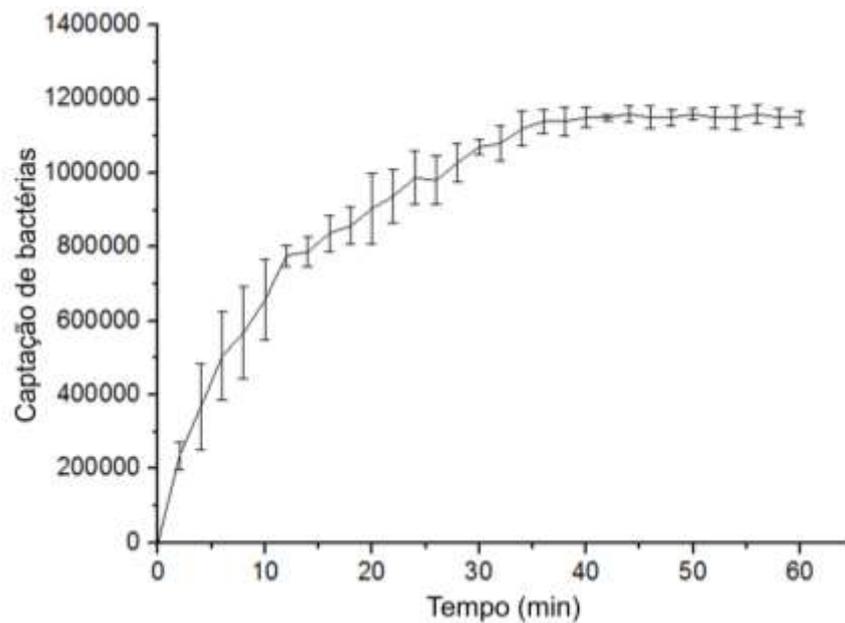


Figura 35. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de cistamina.

É possível observar que a quantidade máxima de bactérias captadas é $1,15 \times 10^6$, havendo uma permanência de captura após 30 minutos, corroborando com os resultados obtidos por Possan *et al.* (2016). A curva apresenta característica sigmoide e entre os modelos matemáticos frequentemente utilizados para curvas não-lineares estão o *Sigmoidal Logistic*, o *Sigmoidal Boltzmann* e o *Sigmoidal Gompertz*. A função sigmoide possui ponto de inflexão, no qual ocorre a taxa máxima de variação da função. Até o ponto de inflexão, o gráfico apresenta concavidade para cima (derivada segunda positiva), no ponto de inflexão a função apresenta derivada segunda nula, e daí em diante, apresenta concavidade para baixo (derivada segunda negativa) (FLORENTINO *et al.*, 2010; MENDES, 2011). Com o uso do *software* Origin 9.0, o ajuste *Sigmoidal Logistic* foi escolhido para interpretar os resultados obtidos neste estudo devido aos parâmetros fornecidos e às aplicações em biossensores

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

magnetoelásticos (HORIKAWA, 2013; POSSAN *et al*, 2016). A equação matemática que representa este modelo é dada por:

$$y = A2 + \frac{(A1 - A2)}{(1 + (x/x0)^p)}$$

Onde os parâmetros A1, A2, x, x0 e p são respectivamente, a quantidade de bactérias inicial, a quantidade de bactérias final, o tempo, o tempo relacionado ao ponto médio da inclinação e a potência de inclinação. Esta análise ainda fornece os posicionamentos percentuais de taxas de ligações de bactérias para uma curva não linear, representado pelos pontos EC20, EC50 e EC80 (GADAGKAR e CALL, 2015). A Figura 36 ilustra o gráfico de bactérias captadas em função do tempo com o ajuste *Sigmoidal Logistic*.

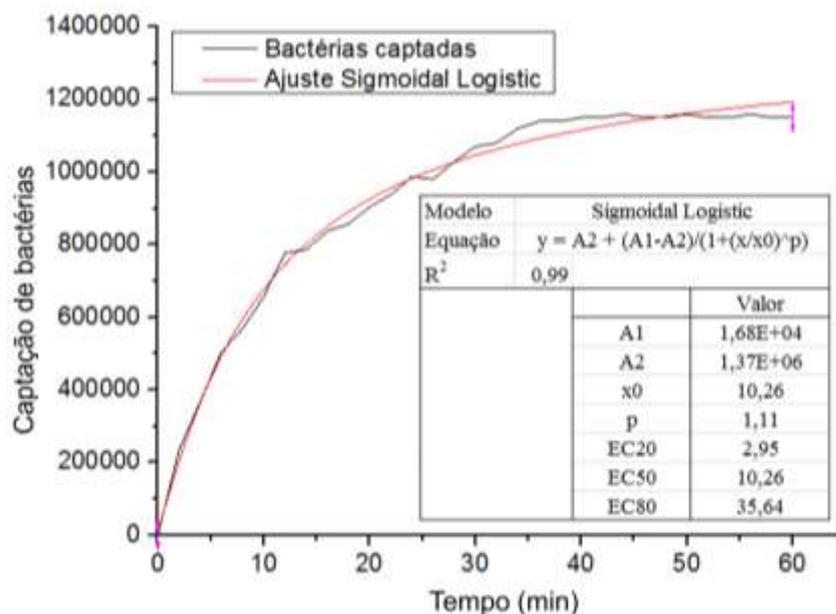


Figura 36. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de cistamina com ajuste *Sigmoidal Logistic*.

O ponto EC20 informa que 20% das bactérias foram captadas em 2,95 minutos, correspondendo à $2,98 \cdot 10^5$ bactérias e representando uma taxa de ligação $1,01 \cdot 10^5$ bactérias por minuto. O ponto EC50 ocorre em 10,26 minutos e representa $6,72 \cdot 10^5$ bactérias captadas na superfície do biossensor, correspondendo, neste ponto, à taxa de ligação de $6,54 \cdot 10^4$ bactérias por minutos. A maioria das bactérias disponíveis (80%) são captadas na superfície do sensor em até 35,64 minutos, conforme informa o ponto EC80. Este tempo corresponde à

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

$1,13 \cdot 10^6$ bactérias captadas e, neste ponto, a taxa de ligação é de $3,18 \cdot 10^4$ bactérias por minuto. O coeficiente de correlação apresentou $R^2 = 0,99$, expressando que o modelo matemático escolhido é apropriado para representar os valores observados, dado que o R^2 varia de 0 a 1.

Para representar a presença de bactérias *E. coli* na superfície do biossensor, foi realizada a microscopia de fluorescência, conforme apresenta a Figura 37. Utilizando o microscópio de fluorescência, a verificação da presença de bactérias que ligaram-se com o anticorpo secundário e conseqüentemente com o anticorpo primário é possível, uma vez que o anticorpo secundário está marcado com fluoresceína (Alexa Fluor 488).

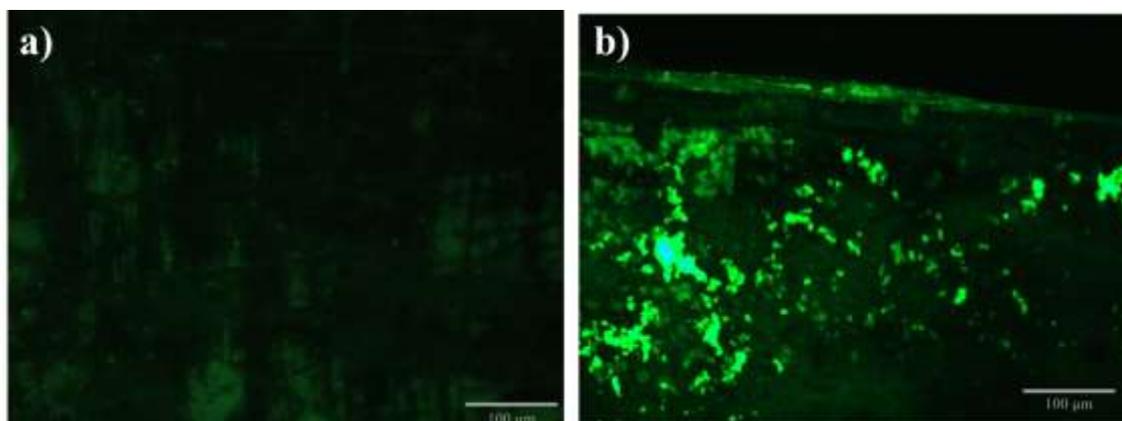


Figura 37. Representação da microscopia de fluorescência do biossensor com deposição de CYS a) biossensor branco b) biossensor com a presença da bactéria *Escherichia coli*.

Observa-se que há uma maior concentração de bactérias em algumas regiões do biossensor magnetoelástico, formando inclusive aglomerados de bactérias que podem ser evidenciadas pela coloração esverdeada. As regiões mais escuras ao fundo indicam a ausência de bactérias.

5.2.2 Avaliação da superfície com ácido mercaptopropiônico, contaminação e análise de frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos

A deposição da SAM de ácido mercaptopropiônico sobre o sensor magnetoelástico polido e revestido com Cr/Au pelo processo de *sputtering* também foi avaliada com AFM e FESEM, conforme ilustram as Figuras 38 e 39, respectivamente. A Tabela 7 contempla os dados obtidos da análise quantitativa dos parâmetros de rugosidade avaliados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

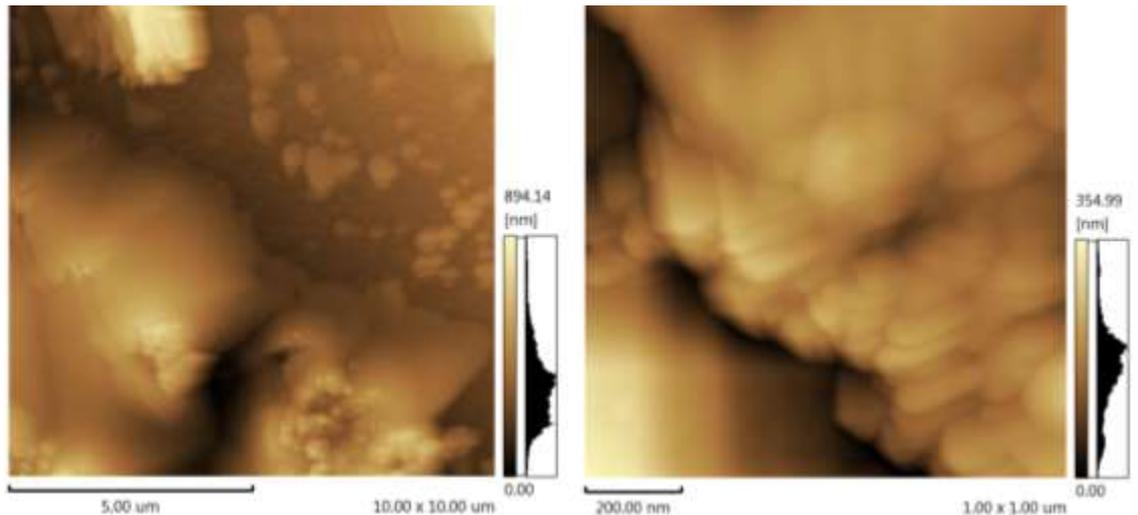


Figura 38. Representação da microscopia de força atômica da superfície do biossensor magnetoelástico com ácido mercaptopropiônico em diferentes áreas de análise.

Tabela 7. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para a deposição de ácido mercaptopropiônico sobre a superfície de ouro do sensor magnetoelástico.

Parâmetros	Superfície com Au	Superfície com ácido mercaptopropiônico
*Ra (nm)	2,8 ±0,1	47,1 ±6,1
**Rq (nm)	3,5 ±0,1	60,2 ±3,1
***Rsk	0,02 ±0,0	0,08 ±0,0

*Ra: rugosidade média absoluta

**Rq: desvio padrão das alturas da superfície

***Rsk: assimetria do perfil de distribuição

Na Figura 36, é possível observar regiões com contrastes mais acentuados, onde as regiões claras e escuras indicam variações de espessura. A topografia da superfície com MPA apresenta um aumento de aproximadamente 17 vezes nos parâmetros de Ra e Rq em relação à superfície com Au indicando a modificação da superfície pela monocamada. O aumento destes parâmetros com deposição de MPA também foi observado por Mishra *et al.* (2012) e Smith *et al.* (2011). A superfície com MPA apresentou maior Ra e Rq quando comparada com a superfície com CYS, porém uma diferença maior entre os valores de Ra e Rq é evidenciada, sugerindo uma camada pouco dispersa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

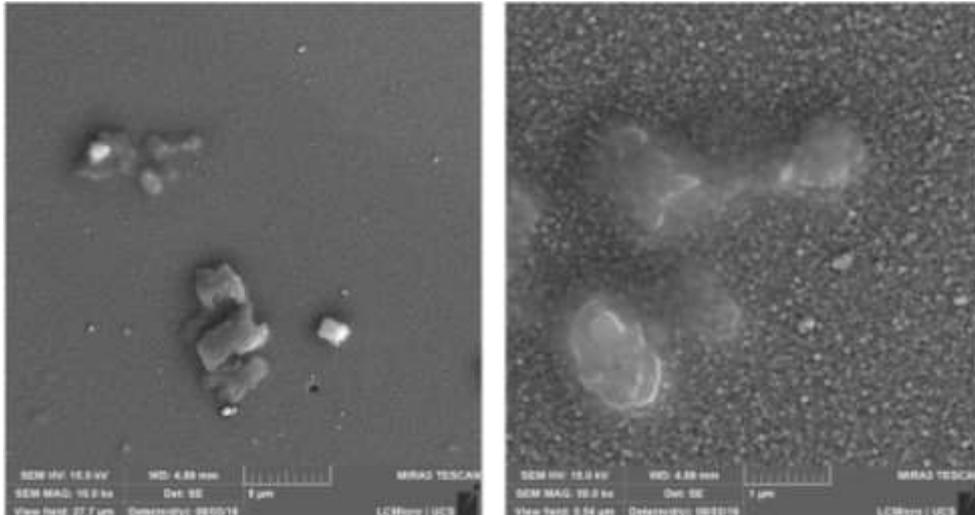


Figura 39. Representação da micrografia FESEM da superfície do biossensor magnetoelástico com ácido mercaptopropiônico em diferentes magnificações.

Na micrografia FESEM não observa-se a presença de placas como na superfície com CYS, mas aglomerados dispersos deixando em evidência o fundo do sensor magnetoelástico, resultando em uma monocamada pobre e pouco difundida.

Após a deposição de MPA executou-se o protocolo de aplicação de anticorpos, intermediado por EDC e Sulfo-NHS e cinco biossensores foram testados sob as mesmas condições. Os dados de Δf coletados, juntamente com o sensor branco, estão ilustrados na Figura 40.

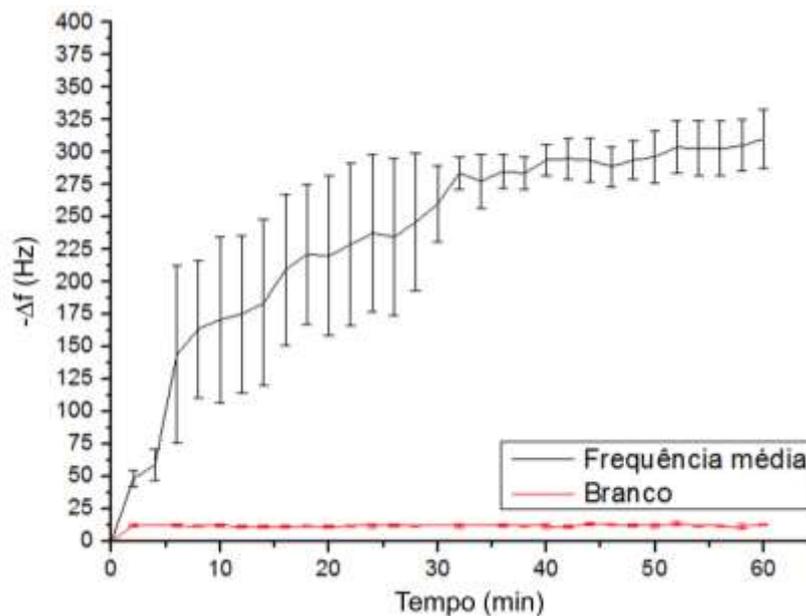


Figura 40. Variação de frequência de ressonância média dos 5 biossensores testados com deposição de ácido mercaptopropiônico juntamente com o sensor branco.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se que há bastante variação de Δf até o tempo da saturação da superfície (aproximadamente 35 minutos), resultando em altos valores de desvio padrão e dificuldade de reprodutibilidade. O sensor branco, composto apenas por MPA, representa uma variação média de frequência de ressonância de 11,6 Hz. Comparando os biossensores com deposição de CYS e MPA, este último apresentou maior capacidade de captação de bactérias, com uma diferença de 89,2 Hz ($\Delta f_{\text{máx}}$: 310 Hz), porém com altos valores de desvio padrão, não apresentando confiabilidade.

As variações na disposição e orientação dos anticorpos colaboram para a falta de reprodutibilidade dos biossensores com SAM terminada em COOH. Conforme indica Chen *et al.* (2003) superfícies modificadas com SAM terminada em NH_2 possuem mais sítios ativos para a ligação com o antígeno do que superfícies modificadas com SAM terminada em COOH (Figura 41).

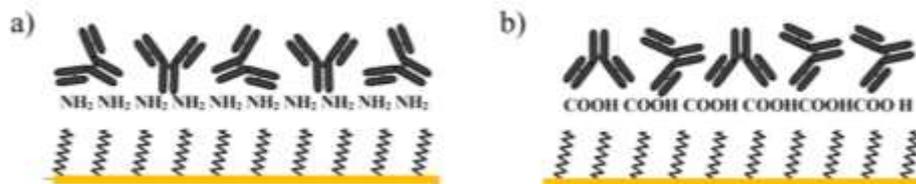


Figura 41. a) anticorpos ligados em superfície com SAM terminada em NH_2 e b) anticorpos ligados em superfície com SAM terminada em COOH (Adaptado de CHEN *et al.*, 2003).

Da mesma forma, os dados de variação de frequência foram convertidos em quantidade de bactérias captadas, conforme ilustrado na Figura 42.

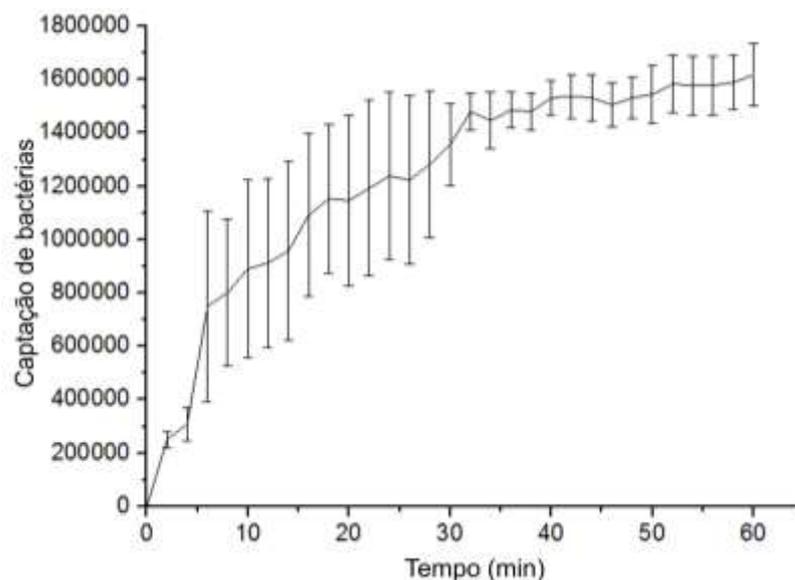


Figura 42. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de ácido mercaptopropiônico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os dados de variação de frequência convertidos em quantidade de bactérias captadas é avaliado que a quantidade máxima de bactérias captadas é $1,62 \times 10^6$. O ajuste matemático *Sigmoidal Logistic* também foi realizado (Figura 43).

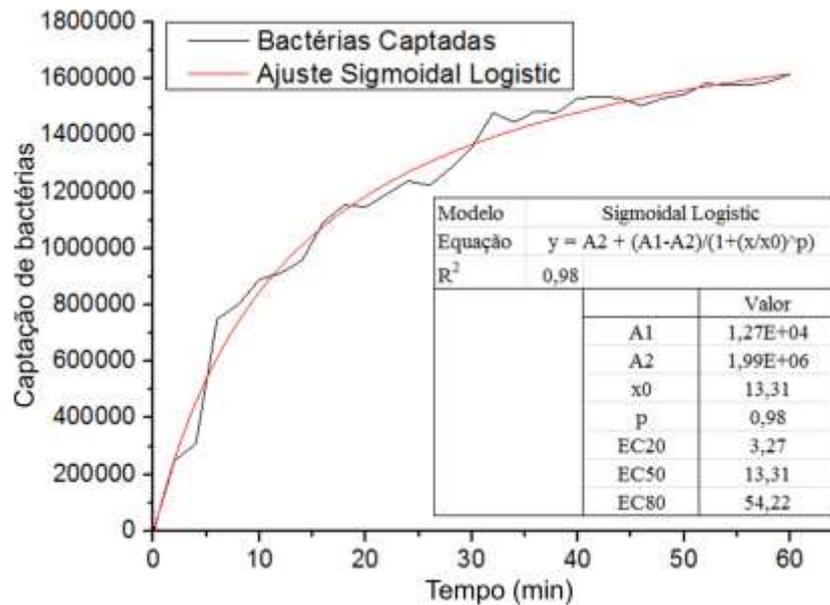


Figura 43. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de ácido mercaptopropiônico com ajuste *Sigmoidal Logistic*.

O ajuste matemático informa que o ponto EC20 ocorre em 3,27 minutos, havendo captação de 20% das bactérias dispostas, correspondendo a $2,87 \cdot 10^5$ bactérias e representando uma taxa de ligação $8,77 \cdot 10^4$ bactérias por minuto. No tempo de 13,31 minutos ocorre o ponto EC50 e informa que $9,42 \cdot 10^5$ bactérias foram captadas na superfície do biossensor, correspondendo, neste ponto, à taxa de ligação de $7,08 \cdot 10^4$ bactérias por minutos. O ponto EC80 representa 80% das bactérias captadas. Ocorre em 54,22 minutos, condizendo com $1,57 \cdot 10^6$ bactérias captadas e corresponde a taxa de ligação de $2,91 \cdot 10^4$ bactérias por minuto. O coeficiente de correlação do modelo matemático escolhido apresentou $R^2 = 0,98$, indicando novamente um bom ajuste.

Para representar a presença de bactérias *E. coli* na superfície do biossensor, foi realizada a microscopia de fluorescência (Figura 44).

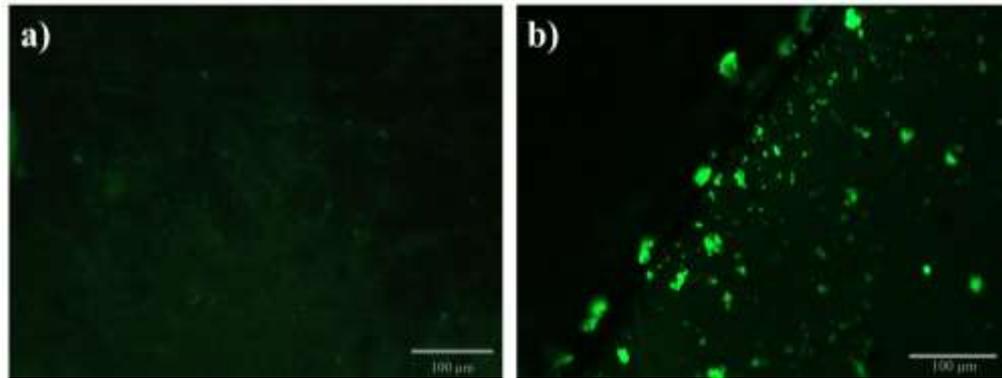


Figura 44. Representação da microscopia de fluorescência do biossensor com deposição de MPA a) biossensor branco b) biossensor com a presença da bactéria *Escherichia coli*.

Na avaliação de microscopia de fluorescência destes biossensores é constatado uma distribuição de bactérias menos uniforme em relação ao biossensor anterior e várias regiões com ausência de bactérias. Estas evidências indicam estar relacionadas com a falta de uniformidade na deposição do MPA sobre a superfície do biossensor e nas variações das ligações de anticorpos com este composto, comprovando a falta de confiabilidade dos biossensores testados com o uso de MPA.

5.2.3 Avaliação da superfície com cisteamina, contaminação e análise de frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos

Da mesma forma, a deposição da SAM de cisteamina sobre o sensor magnetoelástico polido revestido com Cr/Au foi avaliada com AFM e FESEM, conforme representam as Figuras 45 e 46, respectivamente. A Tabela 8 contempla os dados obtidos da análise quantitativa dos parâmetros de rugosidade avaliados.

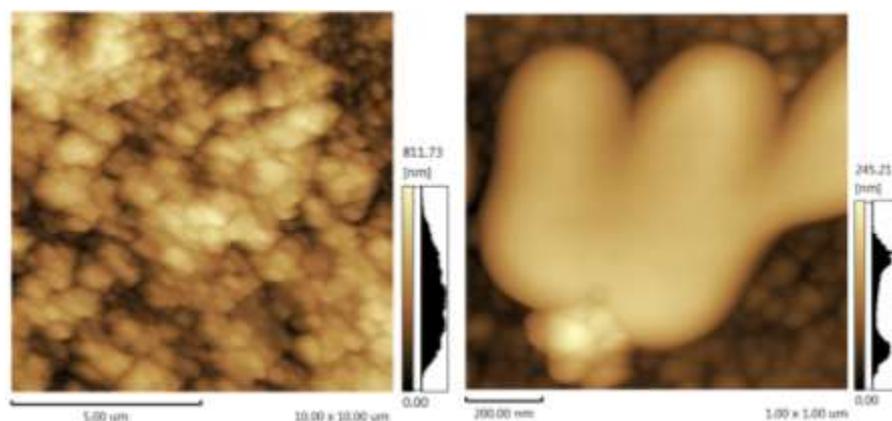


Figura 45. Representação da microscopia de força atômica da superfície do biossensor magnetoelástico com cisteamina em diferentes áreas de análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 8. Parâmetros de rugosidade obtidos através da microscopia de força atômica para a deposição de cisteamina sobre a superfície de ouro do sensor magnetoelástico.

Parâmetros	Superfície com Au	Superfície com cisteamina
Ra (nm)	2,8 ±0,1	20,0 ±1,3
Rq (nm)	3,5 ±0,1	25,6 ±2,2
Rsk	0,02 ±0,0	0,07 ±0,0

*Ra: rugosidade média absoluta

**Rq: desvio padrão das alturas da superfície

***Rsk: assimetria do perfil de distribuição

A microscopia de força atômica da superfície com cisteamina apresentou um aumento dos parâmetros Ra e Rq de aproximadamente 7 vezes em relação à superfície com Au, apontando a modificação pela monocamada. Neste caso, os valores de Ra e Rq também são próximos, sugerindo que esta superfície apresenta poucas irregularidades. Variações de espessura podem ser observadas através das regiões claras e escuras.

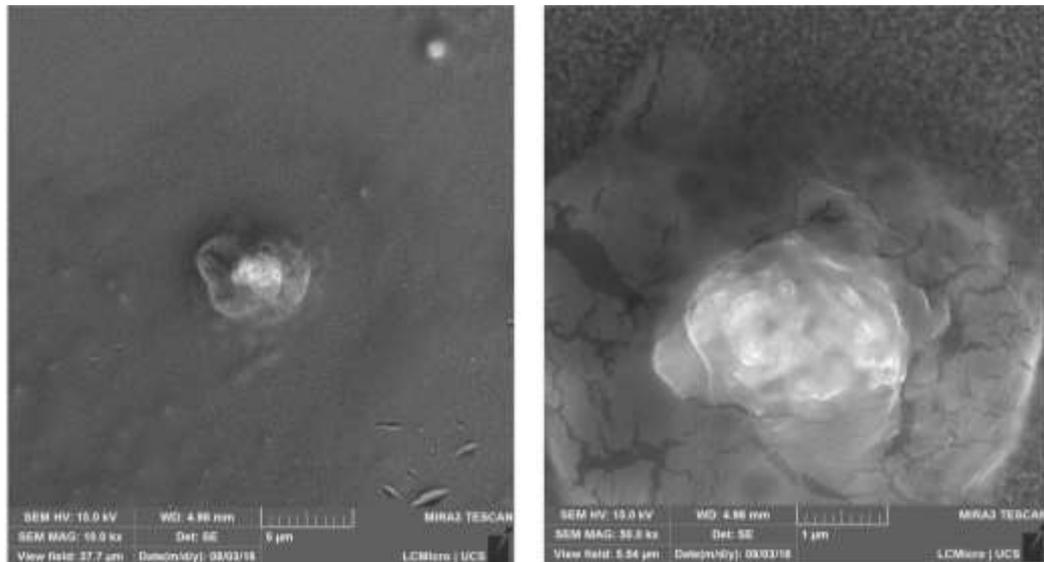


Figura 46. Representação da micrografia FESEM da superfície do biossensor magnetoelástico com cisteamina em diferentes magnificações.

Através da micrografia FESEM, é possível observar que a deposição de cisteamina também não envolve totalmente a superfície do sensor, porém uma continuidade no filme depositado pode ser verificada, diminuindo os espaços vazios, o que favorece a construção do biossensor magnetoelástico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sobre a superfície modificada com CYSTE executou-se o protocolo de aplicação de anticorpos, intermediado por EDC, e novamente cinco biossensores foram testados sob as mesmas condições. Os dados de variação de frequência coletados juntamente com o sensor branco estão ilustrados na Figura 47.

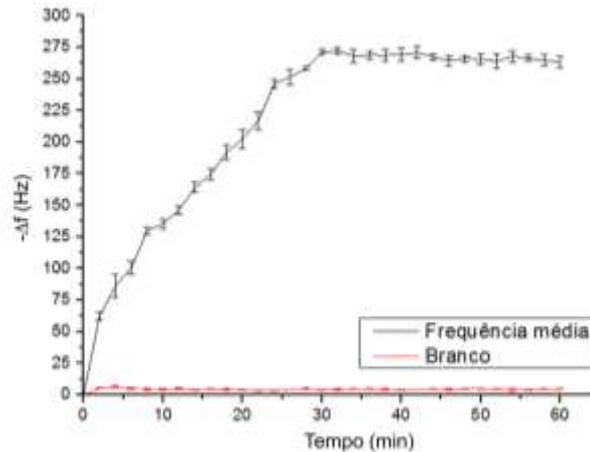


Figura 47. Variação de frequência de ressonância média dos 5 biossensores testados com deposição de cisteamina juntamente com o sensor branco.

Os biossensores testados com a deposição de cisteamina também apresentaram saturação em aproximadamente 35 minutos. Baixos valores de desvio padrão são observados, indicando uma monocamada dispersa, favorecendo a ligação de anticorpos através do grupo terminal amina. O sensor branco, composto por cisteamina, também apresentou menores valores em relação aos demais, com uma frequência de ressonância média de 4,1 Hz. A Figura 48 ilustra os dados de variação de frequência convertidos em quantidade de bactérias captadas na superfície do biossensor.

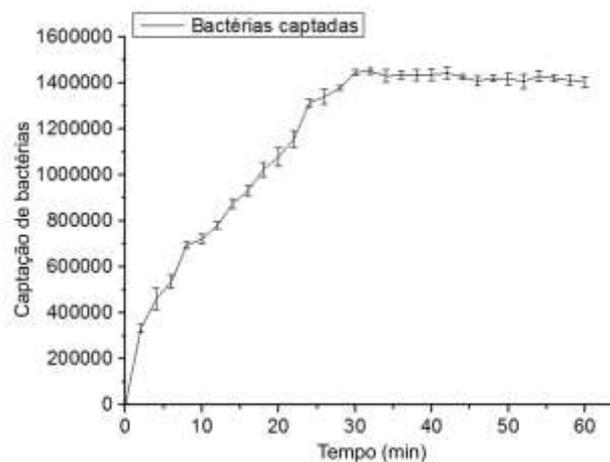


Figura 48. Bactérias captadas na superfície do biossensor testado com deposição de cisteamina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação máxima (média) da frequência de ressonância foi de 272,18 Hz correspondendo a captação de $1,45 \cdot 10^6$ bactérias. Este valor é inferior aos biossensores testados com a SAM de ácido mercaptopropiônico e maior em relação à SAM de cistamina. Apesar do MPA e da CYSTE serem tióis de cadeia curta e diferenciarem-se somente pelo grupamento terminal, Mendes (2006) sugere que a monocamada formada por CYSTE é mais estável, pois necessita de maior energia para se desprender do metal e o grupamento terminal amina facilita a transferência de elétrons durante a formação da SAM. Da mesma forma que os biossensores anteriores, o ajuste ao modelo matemático *Sigmoidal Logistic* também foi realizado (Figura 49).

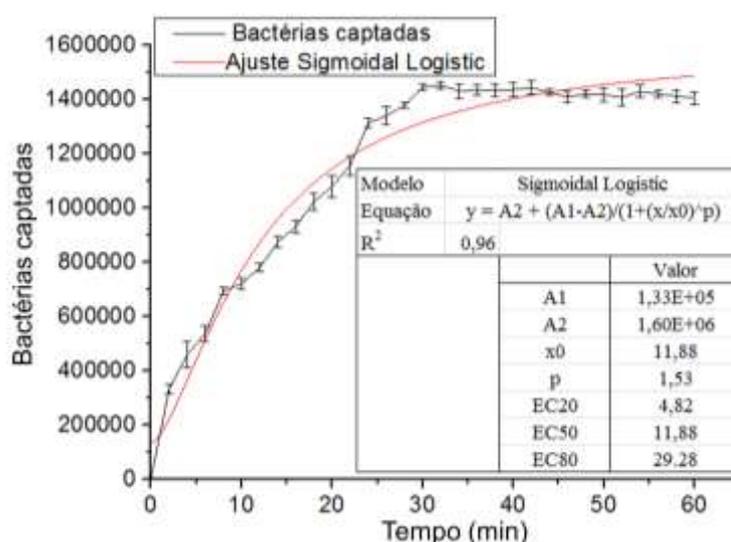


Figura 49. Bactérias captadas na superfície do biossensor com deposição de cisteamina com ajuste *Sigmoidal Logistic*.

O ajuste dos dados ao modelo matemático *Sigmoidal Logistic* informa a ocorrência do ponto EC20 em 4,82 minutos, representando $4,90 \cdot 10^5$ bactérias captadas à taxa de $1,01 \cdot 10^5$ bactérias por minuto. No tempo de 11,88 minutos $7,76 \cdot 10^5$ bactérias são captadas na superfície do biossensor à uma taxa de $6,53 \cdot 10^4$ bactérias por minuto, correspondendo a 50% das bactérias captadas. O ponto EC80 representa $1,42 \cdot 10^6$ bactérias captadas em 29,28 minutos com uma taxa de captação de $4,85 \cdot 10^4$ bactérias por minuto.

Em todos os casos é observada uma diminuição da taxa de ligação com o passar do tempo, indicando o tempo de saturação. Na superfície com deposição de MPA o ponto EC80 ocorre somente em 54 minutos, diferentemente das superfícies com CYS e CYSTE onde este ponto ocorre em torno de 35 e 30 minutos respectivamente, condizentes com, aproximadamente, o tempo de saturação da superfície do biossensor magnetoelástico. Isso

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

indica uma melhoria na superfície com CYSTE quando comparada com os demais tióis analisados, onde a ligação das bactérias com os anticorpos ocorre mais rapidamente apresentando maior potencial de captação do patógeno.

A presença de bactérias na superfície do biossensor com deposição de CYSTE também foi representada por microscopia de fluorescência, conforme ilustra a Figura 50.

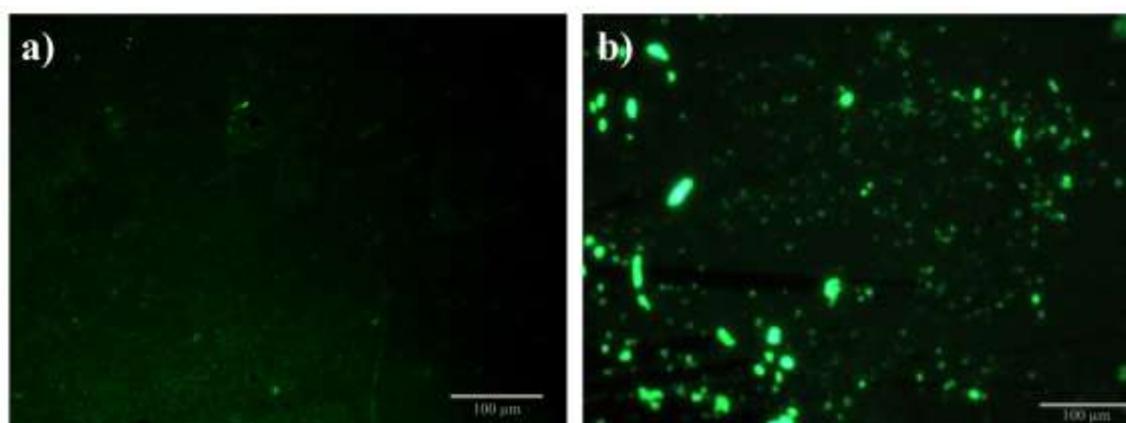


Figura 50. Representação da microscopia de fluorescência do biossensor com deposição de CYSTE a) biossensor branco b) biossensor com a presença da bactéria *Escherichia coli*.

A microscopia de fluorescência dos biossensores testados com deposição de CYSTE também apresenta regiões sem bactérias, porém uma melhor dispersão das bactérias sobre a superfície e poucos aglomerados são observados, evidenciando um melhoramento nestes biossensores. A imagem mais uma vez constata que a variação da frequência de ressonância foi devido às bactérias ligadas na superfície.

5.3 LIMITES DE DETECÇÃO E EFICIÊNCIA DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS

O limite de detecção informa a concentração mínima detectável dos biossensores magnetoelásticos. A Tabela 9 contempla os valores do limite de detecção estimados para cada composto testado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 9. Limites de detecção para os biossensores testados com deposição de CYS, MPA e CYSTE para detecção de *Escherichia coli*.

	Biossensor com CYS	Biossensor com MPA	Biossensor com CYSTE
S_{med} (Hz)	9,02	33,13	4,13
Limite de detecção (bactéria.mL ⁻¹) ^a	4,7.10 ⁴	1,7.10 ⁵	2,1.10 ⁴
Limite de detecção (ng.mL ⁻¹) ^a	46,9	173,0	21,7

^a Horikawa, 2013 ; Possan *et al*, 2016

O biossensor com deposição de MPA apresentou o maior limite de detecção, seguido pelo biossensor com deposição de CYS e CYSTE. Novamente o biossensor com CYSTE mostrou melhores resultados em comparação aos demais compostos analisados confirmando um melhoramento na utilização deste composto para a formação de SAM.

A eficiência dos biossensores pode ser estimada considerando que a variação da frequência de ressonância máxima para sensores de 5 x 1 mm com captação de *E. coli* é 376 Hz (POSSAN *et al.*, 2016). A Tabela 10 apresenta a eficiência estimada dos biossensores testados considerando o valor teórico de 376 Hz como variação máxima de frequência de ressonância.

Tabela 10. Eficiência estimada para os biossensores testados com deposição de CYS, MPA e CYSTE para detecção de *Escherichia coli*.

	$\Delta f_{teórico}$ (Hz)	$\Delta f_{máximo}$ (Hz)	Eficiência (%)
Biossensores com CYS		220,8	58,7
Biossensores com MPA	376,0	310,0	82,4
Biossensores com CYSTE		272,1	72,3

O biossensor de superfície modificada com MPA apresentou maior eficiência em relação aos demais, porém conforme já discutido anteriormente, estes biossensores não apresentaram confiabilidade e reprodutibilidade. Assim, os biossensores testados com CYSTE, quando comparado aos biossensores analisados com CYS, apresentaram maior eficiência evidenciando um aprimoramento na utilização deste composto para detecção de *E. coli* com o uso de biossensores magnetoelásticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS COM O USO DE BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS

A Tabela 11 apresenta os dados utilizados na análise estatística e a Tabela 12 contempla a análise ANOVA dos dados experimentais obtidos com o ajuste matemático *Sigmoidal Logistic* para a quantidade de bactérias capturadas na superfície do biossensor magnetoelástico com cada diferente tiól estudado.

Tabela 11. Dados experimentais de captação de bactérias na superfície do biossensor magnetoelástico com cada diferente tiól estudado obtidos com o ajuste matemático *Sigmoidal Logistic*.

Posicionamentos percentuais	Bactérias captadas com diferentes tióis		
	CYS	MPA	CYSTE
Ec 20	$2,98.10^5$	$2,87.10^5$	$4,90.10^5$
Ec 50	$6,72.10^5$	$9,42.10^5$	$7,76.10^5$
Ec 80	$1,13.10^6$	$1,57.10^6$	$1,42.10^6$
Captação máxima	$1,37.10^6$	$1,99.10^6$	$1,60.10^6$

Tabela 12. Análise ANOVA dos dados experimentais obtidos com o ajuste matemático *Sigmoidal Logistic* para a quantidade de bactérias capturadas na superfície do biossensor magnetoelástico com cada diferente tiól estudado.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	Valor P	F _{crítico}
Fator A*	$3,04.10^{12}$	3	$1,01.10^{12}$	44,25	0,0001	3,28
Fator B**	$2,21.10^{11}$	2	$1,10.10^{11}$	4,83	0,0560	3,46
Erro	$1,37.10^{11}$	6	$2,29.10^{10}$			
Total	$3,40.10^{12}$	11				

*Fator A: posicionamentos percentuais

**Fator B: diferentes tióis

Observa-se nos dados da Tabela 12 que os valores de $F_{\text{calculado}}$ mostraram-se maiores em comparação com o $F_{\text{crítico}}$ e o valor P também apontou ser menor que o nível de significância ($\alpha = 0,1$). Assim, com 90% de significância é possível afirmar que há diferenças significativas entre os grupos, provocada pelo fator controlável de estudo, ou seja, pelo diferente tiól empregado. Realizou-se também a comparação múltipla de médias pelo método de Duncan, conforme exhibe a Tabela 13. A diferença será significativa se a comparação das médias for maior que o limite de decisão (Ld).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 13. Comparação múltipla de médias dos dados estatísticos obtidos com os biossensores magnetoelásticos.

Fator A Ld: $3,02 \cdot 10^5$			Fator B Ld: $2,62 \cdot 10^5$		
	Ordem crescente das médias	Comparação		Ordem crescente das médias	Comparação
Ec20	$3,56 \cdot 10^5$	$4,40 \cdot 10^5$			
Ec50	$7,96 \cdot 10^5$	$5,74 \cdot 10^5$	CYS	$8,67 \cdot 10^5$	$2,03 \cdot 10^5$
Ec80	$1,37 \cdot 10^6$	$2,80 \cdot 10^5$	CYSTE	$1,07 \cdot 10^6$	$1,30 \cdot 10^5$
Máximo	$1,65 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^6$	MPA	$1,20 \cdot 10^6$	$3,33 \cdot 10^5$

Os dados dispostos na Tabela 13 informam que, no caso dos posicionamentos percentuais (Fator A), a diferença é significativa somente em EC20 e EC50, não apresentando diferença significativa entre o ponto EC 80 e o ponto máximo. Os dados obtidos com os diferentes tióis (Fator B) informam que não há diferença significativa entre o uso de CYS e CYSTE, a diferença ocorre somente com o uso de MPA.

A análise estatística realizada aponta que é indiferente o uso de CYS e CYSTE, porém vale ressaltar que o uso de CYSTE apresentou maior captação de bactérias, menor limite de detecção e maior eficiência em relação à CYS. A utilização de CYSTE também mostrou ser mais estável em comparação aos demais tióis testados, uma vez que a média do desvio padrão para este composto foi de 4,16 Hz, enquanto que para CYS e MPA foram 9,07 Hz e 33,14 Hz, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

O AFM demonstrou ser uma ferramenta útil nas análises das fitas magnetoelásticas. A escolha de operação do equipamento no modo *tapping* para realizar a varredura nas imagens mostrou-se adequada para quantificar os parâmetros de rugosidade avaliados. As superfícies lisas e rugosas revestidas pelo processo de eletrodeposição apresentaram menores valores de rugosidade em relação às superfícies com deposição de Cr/Au por *sputtering*, porém orifícios foram observados, podendo comprometer o processo de construção dos biossensores, sendo necessário investir mais tempo na melhoria e aprimoramento deste processo. A superfície polida revestida com Cr/Au pelo processo de *sputtering* apresentou menores valores de Ra e Rq e melhor perfil de distribuição em relação às superfícies lisas e rugosas revestidas pelo mesmo processo, sendo escolhida para a construção dos biossensores magnetoelásticos.

O desempenho dos biossensores magnetoelásticos para a detecção de *E. coli* foi investigado frente a deposição de diferentes tióis. As análises de AFM das superfícies com cistamina, ácido mercaptopropiônico e cisteína permitem afirmar que a superfície foi modificada com os compostos estudados, devido ao aumento de Ra e Rq em relação à superfície com Au. Os dados de variação de frequência de ressonância analisados permitem concluir que a maior captação de bactérias na superfície do biossensor ocorre em até aproximadamente 35 minutos, havendo saturação da superfície após este tempo. Os biossensores com deposição de MPA mostraram um aumento na captação de bactérias em relação aos biossensores com CYS e CYSTE, porém altos valores de desvio padrão foram observados, dificultando a reprodutibilidade e confiabilidade do dispositivo.

Os biossensores testados com deposição de CYSTE apresentaram melhores resultados em relação aos biossensores testados com CYS, confirmando o que apresenta a literatura, que tióis de cadeia longa podem passivar a superfície, diminuindo a transferência de elétrons e conseqüentemente a sensibilidade do dispositivo. Os biossensores com CYSTE também apresentaram menor limite de detecção apontando um melhoramento na utilização deste composto para detecção de *E. coli*. De maneira geral, os resultados foram favoráveis para a detecção da bactéria *E. coli*, evidenciando que o tamanho da cadeia carbônica e o grupamento terminal influenciam na eficácia da imobilização deste patógeno em biossensores magnetoelásticos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É considerável avaliar o desempenho dos biossensores magnetoelásticos frente diferentes concentrações de bactérias e diferentes patógenos. A sensibilidade do dispositivo pode ser melhorada, reduzindo o tamanho do sensor. Outro fator importante para a comercialização do dispositivo é qualificar a estabilidade do biossensor proposto. A formação da SAM pode ser investigada pela técnica de microscopia de tunelamento por varredura (STM – *Scanning Tunneling Microscope*). Estudar a hidrofobicidade dos diferentes tióis empregados. A avaliação das interações antígeno-anticorpo com a técnica de funcionalização de pontas de AFM também pode ser empregada.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza (Espanha): Acribia, 1997. 464p.

ADÁNYI, N., VÁRADI, M., KIM, N., SZENDRO, I. Development of new immunosensors for determination of contaminants in food. **Current Applied Physics**, p. 279-286, 2006.

ALMEIDA, I.B.B. **(Bio)Funcionalização de superfícies de ouro via formação de ditiocarbamatos**. 2010. 129p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

ANI, J.U., NNAJI, N.J.N., ONUKWULI, O.D., OKOYEA, C.O.B. Nephelometric and functional parameters response of coagulation for the purification of industrial wastewater using *Detarium microcarpum*. **Journal of Hazardous Materials**, n. 243, p. 59-66, 2012.

AYOUB, S., BEAULIEU, L.Y. The surface morphology of thin Au films deposited on Si(001) substrates by sputter deposition. **Thin Solid Films**, n.534, p.54–61, 2013.

BALL, C.J., PUCKETT, L.G., BACHAS, L. Covalent Immobilization of α -Galactosidase onto a Gold-Coated Magnetoelastic Transducer via a Self-Assembled Monolayer: Toward a Magnetoelastic Biosensor. **Analytical Chemistry**, n. 24, v.75, p. 6932-6937, 2003.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. São Paulo: Atheneu, 1999. 196p.

BENJAMINI, E., COICO, R., SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.35, 288p., 2002.

BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BOTARO, B.G. **Deteção e contagem de *Staphylococcus aureus* da mastite bovina em amostras de leite pelo método de quantificação da reação em cadeia da polimerase em tempo real**. 2012. 98p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BRUSHAN, B.; MARTI, O. **Scanning Probe Microscopy – Principle of Operation, Instrumentation, and Probes**. Nanotribology and nanomechanics I, 2011. Disponível em: <<http://www.springer.com/978-3-642-15282-5/>>. Acesso em: 31 mar. 2015.

BRAIEK, M., ROKBANI, K.B., CHROUDA, A., MRABET, B., BAKHROUF, A., MAAREF, A., RENAULT, N. Electrochemical Immunosensor for detection of *Staphylococcus aureus* Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold Electrode. **Biosensors**, v.2, p. 417-426; doi: 10.3390/bios2040417, 2012.

REFERÊNCIAS

- BRIAND, E., GU, C., BOUJDAY, S., SALMAIN, M., HERRY, J.M., PREDIER, C. M. Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs: Topography/bioactivity relationship - A combined FT-RAIRS, AFM and QCM investigation. **Surface Science**, n. 601, p. 3850-3855, 2007.
- CANCINO, C.J. **Eletrodos modificados como monocamadas auto-organizadas de alcanotóis: uma abordagem sobre a transferência eletrônica**. 2008. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- CELEDÓM, C., FLORES, M., HABERLE, P., VALDÉS, J.E., Surface Roughness of Thin Gold Films and its Effects on the Proton Energy Loss Straggling. **Brazilian Journal of Physics**, vol. 36, p. 956-959, 2006.
- CHAI, Y., WIKLE, H., WANG, Z., HORIKAWA, S., BEST, S., CHENG, Z., DYER, D.F., CHIN, B. Design of a surface-scanning coil detector for direct bacteria detection on food surfaces using a magnetoelastic biosensor. **Journal of Applied Physics**, n.114, p. 114-120, 2013.
- CHAKI, N.K., VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications: Review. **Biosensors and Bioelectronics**, n.17, p.1-12, 2001.
- CHEN, S., LIU, L., ZHOU, J.; JIANG, S. Controlling antibody orientation on charged self-assembled monolayer. **Langmuir**, n.19, p. 2859-2864, 2003.
- COELHO, D. **Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico**. 2011. 120p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- COSTA, R.P. **Caracterização de materiais por Scanning Probe Microscope (SPM)**. 2010. 77p. Relatório de iniciação científica - Centro Universitário da FEI, São Bernardo do Campo, 2010.
- FERREIRA, A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v.29, p. 137-142, 2006.
- FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; OLIVEIRA, D. R.; COSTA, P. I.; GÜELL, A. G.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-*T. cruzi* by AFM and amperometric measurements. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 24, p. 5046-5052, 2006.
- FIALHO, A.C.V. **Biossegurança no controle da infecção hospitalar: desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção de *Staphylococcus aureus* em áreas críticas hospitalares**. 196p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

REFERÊNCIAS

FISCHER, J.A. **Estudo da formação de monocamadas auto-organizadas de tióis sobre Au (111)**. 83p. Dissertação (Mestre em Física) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FLORENTINO, H. D. O.; BISCARO, A. F. V.; PASSOS, J. R. D. S. Funções sigmoidais aplicadas na determinação da atividade metanogênica específica (AME). **Revista Brasileira de Biomedicina**, v.28, n.1, p. 141-150, 2010.

FOOD BORN BURDEN. **Estimates of food borne illness in the United States**, 15 de setembro de 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/index.html>. Acesso em: 15 Set. 2016.

FUNG, Y.S., WONG, Y.Y. Self-assembled monolayers as the coating a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect *Salmonella* in aqueous solution. **Analytical Chemistry**, v. 73, n.21, p. 5302-5309, 2001.

GADELMAWLA, E.S.; KOURA, M.M.; MAKSOUD, T.M.A.; ELEWA, I.M.; SOLIMAN, H.H. Roughness parameters. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 123, p. 133-145, 2002.

GADAGKAR, S., CALL, G.B. Computational tools for fitting the hill equation to dose response curves. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p.68-76, 2015.

GALLI, A. **Desenvolvimento de um biossensor bioenzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos**. 2009. 143p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

GRIMES, C.A. *et al.* Theory, Instrumentation and Applications of Magnetoelastic Resonance Sensors: A Review. **Sensors**, v.11, p.2809-2844; doi:10.3390/s110302809, 2011.

GRIMES, C.A. *et al.* Wireless Magnetoelastic Resonance Sensors: A Critical Review. **Sensors**, v.2, p. 294-313, 2002.

GRIMES, C.A. *et al.* Magnetoelastic sensors for remote query environmental monitoring. **Smart Materials and Structures**, v.8, n.5, 1999.

GUIA DE MICROBIOLOGIA. **Controle microbiológico na indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**, 1ª ed, 2015. Disponível em: <<http://abihpec.org.br/guia-microbiologia>>. Acesso em: 13 Out. 2016.

HARMANSON, G. T. Chapter 1 - Functional Targets. In: HERMANSON, G. T. (Ed.). **Bioconjugate Techniques (Second Edition)**. New York: Academic Press p.1-168. 2008a.

REFERÊNCIAS

_____. **Chapter 3 - Zero-Length Crosslinkers**. New York: Academic Press, p. 213-233, 2008b.

HENKE, L.; NAGY, N.; KRULL, U. An AFM determination of the effects on surface roughness caused by cleaning of fused silica and glass substrates in the process of optical biosensor preparation. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 547-555, 2001.

HUANG, S., WANG, Y., GE, S., CAI, Q., GRIMES, C. Quantification of *Staphylococcus epidermidis* using a wireless, mass-responsive sensor. **Sensors and Actuators B**, n.150, p. 412-416, 2010.

HOPKINS, M. **Imunoglobulinas, estrutura e função**. Imunologia, Microbiologia e Imunologia on-line, 2009. Disponível em: < <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter4.htm> >. Acesso em: 09 Set. 2015.

HORIKAWA, S., BEDI, D., LI, S., SHEN, W., HUANG, S., CHEN, H., CHAI, Y., AUAD, M.L., BOZACK, M.J., BARBAREE, J.M., PETRENKO, V.A., CHIN, B. Effects of surface functionalization on the surface phage coverage and the subsequent performance of phage-immobilized magnetoelastic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 26, p. 2361-2367, 2011.

HORIKAWA, S. **Low-Cost, Rapid, Sensitive Detection of Pathogenic Bacteria Using Phage-Based Magnetoelastic Biosensors**. 2013. (Tese de Doutorado). Auburn: 2013, p. 166. 2013.

JAIN, M. K.; SCHMIDT, S.; GRIMES, C. A. Magneto-acoustic sensors for measurement of liquid temperature, viscosity and density. **Applied Acoustics**, v. 62, n. 8, p. 1001-1011, 2001.

JING, H., JIE, W., YUN, C., JIAN, F. Detection of *Staphylococcus Aureus* in different liquid mediums using wireless magnetoelastic sensor. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v.38, p. 105-108, 2010.

JÚNIOR, A.G.B. **Desenvolvimento de processos de bioconjugação empregando pontos quânticos fluorescentes de semicondutores II-IV**. 2010. 101p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

KULICKE. Wafer Saw. **The Micro / Nano Fabrication Center**, Arizona Research Labs, 2014. Disponível em: < http://mfc.engr.arizona.edu/Matrix/wafer_saw.htm >. Acesso em: 26 Set. 2016.

LEE, K.-M.; RUNYON, M.; HERRMAN, T. J.; PHILLIPS, R.; HSIEH, J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, n. 0, p. 264-276, 2014.

REFERÊNCIAS

LEVINSON, W.; JAWETS, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 632p.

LOVE, C.J.; ESTROFF, L.A.; KRIEBEL, J.K.; NUZZO, R.G.; WHITESIDES, G.M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. **Chemical reviews**, v.105, n.4, p.1103-1169, 2005.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p.2-12, 2013.

MANDAL, A. **Different functions of different parts of the antibody**. Antibody Function, 2012. Disponível em: <<http://www.news-medical.net/health/Antibody-Function.aspx>>. Acesso em: 09 Set. 2015.

MENDES, R.K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 2006. 128p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MENDES, P.N. **Ajuste dos modelos Gompertz e Logístico na descrição das curvas de crescimento de tomates: uma abordagem baynesiana**. 2011. 83p. Tese (Doutorado em estatística e experimentação agropecuária) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011.

METGLAS. **Metglas® 2826MB Magnetic Alloy**. Magnetic Materials, Metglas Products, 2011. Disponível em: <http://www.metglas.com/products/magnetic_materials/>. Acesso em: 23 Mar. 2015.

MICROBIOLOGY ATLAS. **Microbiology in pictures. Escherichia coli**, 2011. Disponível em: <<http://www.microbiologyinpictures.com/escherichia%20coli.html>>. Acesso em: 23 Mai. 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DESENVOLVIMENTO. Instrução Normativa nº 62, 2011. Disponível em: <<http://www.apcbrh.com.br/files/IN62>>. Acesso em: 05 Out. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da saúde faz alerta sobre surto de infecção por bactéria**. Agência Nacional de Saúde Suplementar, 2011. Disponível em: <<http://www.ans.gov.br/a-ans/sala-de-noticias-ans/qualidade-da-saude/625-ministerio-da-saude-faz-alerta-sobre-surto-de-infeccao-por-bacteria>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

MIRANDA, G.C. **Novos biossensores baseados em anticorpos naturais e sintéticos para detecção de LDL oxidada (oxLDL) usada como biomarcador de aterosclerose**. 2014. 111p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

REFERÊNCIAS

MISHRA, S.J., KUMAR, D., BIRADAR, A.M., RAJESH. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of mercaptopropionic acid capped ZnS nanocrystal based bioelectrode for the detection of the cardiac biomarker - myoglobin. **Bioelectrochemistry**, v.88, p. 118-126, 2012.

MOCCELINI, S.K. **Sensores modificados com monocamadas auto-organizadas de tióis para determinação de dopamina, tiodicarbo e catequina**. 2011. 130p. Tese (Doutor em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MOREAU, A.L.D. **Processamento e funcionalização de pontas para aplicações biológicas de microscopia de força atômica**. 2005. 101p. Dissertação (Mestre em Física) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005..

MOSCON, P.S. **Textura magnética, distribuição de anisotropia e efeitos magnetomecânicos em metais amorfos magnetostrictivos obtidos por *Melt-Spinning***. 2009. 154P. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

MOSSANHA, R. **Preparação, caracterização e estudos eletroquímicos de eletrodos modificados com diferentes monocamadas auto-organizadas**. 2011. 160p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

MOROSINI, M.I. **Current issues in multi drug resistant gram negatives – *Escherichia coli***. In: International Congress on Infectious Diseases (ICID), 14., 2010, Florida, USA.

NABIYOUNI, G., FARAHANI, B.J. Anomalous scaling in surface roughness evaluation of electrodeposited nanocrystalline Pt thin films. **Applied Surface Science**, v. 256, p.674-682, 2009.

NATURDATA. **Biodiversidade on line. *Escherichia coli* (Migula 1896) Castellani and Charmers**, 2011. Disponível em: < <http://naturdata.com/Escherichia-coli-39451.htm>>. Acesso em: 24 Mai. 2016.

NETO, A.T.S. **Marcação de antígenos eritrocitários do sistema ABO com nanopartículas fluorescentes de semicondutores**. 2012. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

NETO, P.L., PARENTE, M., MOREIRA, I., DIOGENES, I., MATTOS, O.R., BARCIA, O.E., SANTOS, R.P., FREIRE, V. AFM and hydrodynamic electrochemical characterization of the self-assembled 1,4-dithiane on gold surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 603, p. 21-26, 2007.

REFERÊNCIAS

OUERGHY, O., TOUHAMI, A., OTHMANE, A., BEN QUADA, H., MARTELET, C., FRETIGNY, C., RENAULT, J.N. Investigating specific antigen/antibody binding with the atomic force microscope. **Biomolecular Engineering**, n. 19, p. 183-188, 2002.

POSSAN, A.L. **Biosensor magnetoelástico para a detecção de *Escherichia coli***. 2015. 105p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos e Tecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2015.

POSSAN, A.L.; MENTI, C.; BELTRAMI, M.; SANTOS, A.D.; ROESCH-ELY, M.; MISSELL, F.P. Effect of surface roughness on performance of magnetoelastic biosensor for the detection of *Escherichia coli*. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 541-547, 2016.

RAITERI, R., GRATAROLA, M., BUTT, H., SKLADAL, P. Micromechanical cantilever-based biosensor. **Sensors and Actuators B Chemical**, n. 79, p. 115-126, 2001.

RANIERI, A.; BATTISTUZZI, G.; BORSARI, M.; CASALINI, S.; FONTANESI, C.; MONARI, S.; SIWEK, M. J.; SOLA, M. Thermodynamics and kinetics of the electron transfer process of spinach plastocyanin adsorbed on a modified gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 626, n. 1–2, p. 123-129, 2009.

RUAN, C., ZENG, K., VARGHESE, O., GRIMES, C. A magnetoelastic bioaffinity-based sensor for avidin. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 19, p. 1695 - 1701, 2004.

RUAN, C., ZENG, K., VARGHESE, O., GRIMES, C. Magnetoelastic Immunosensors: amplified mass immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytical Chemistry**, v. 75, n.23, p. 6494-6498, 2003.

SANTOLIN, M. A. **Nanolitografia de silício utilizando microscopia de força atômica**. 2009. 97p. Dissertação (Mestrado em física) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

SCHLENOFF, J. B.; LI, M.; LY, H. Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 50, p. 12528-12536, 1995.

SEZONOV, G., PETIT, D.J., ARI, R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, 2007.

SHEN, W., LAKSHMANA, R., MATHISON, L., PETRENKO, V., CHIN, B. Phage coated magnetoelastic micro-biosensors for real-time detection of *Bacillus anthracis* spores. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n.137, p.501-506, 2009.

SHEN, W., MATHISON, L., PETRENKO, V., CHIN, B. Design and characterization of a magnetoelastic sensor for the detection of biological agents. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 43, n. 1, p. 015004, 2010.

REFERÊNCIAS

SHINDO, M., SAWADA, T., DOI, K., MUKAI, K., SHUDO, K. Spectroscopic analysis of a nanostructure roughness of plasma-deposited Au films using organic monolayer. **Journal of Physics: Conference Series**, v.441, 2013.

SINGHA, A., GLASS, N., TOLBA, M., BROVKO, L., GRIFFITHS, M., EVOYA, S. Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens. **Biosensors and Bioelectronics**, v.24, p. 3645–3651, 2009.

SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry**. 9.ed. Belmont, Estados Unidos: Cengage Learning, 1048p. 2014.

SMITH, S.R., GUERRA, E., SIEMANN, S., SHEPHERD, J.L. Au dissolution during the anodic response of short-chain alkylthiols with polycrystalline Au electrodes. **Electrochimica Acta**, v.56, p. 8291-8298, 2011.

STEFFENS, C., LEITE, F.L., BUENO, C.C., MANZOLI, A., HERRMANN, P.S.P. Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors. **Sensors**, v.12, p. 8278-8300, 2012.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 531p.

SU, X., LI, Y. A self-assembled monolayer based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, n.19, p. 563-574, 2004.

TANG, Q., SHI, S., ZHOU, L. Nanofabrication with Atomic Force Microscopy: Review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, n. 8, p. 948-960, 2004.

THE WALL STREET JOURNAL. **Gold Medal, Gold Medal Wondra, and Signature Kitchens Flour Recalled Due to Possible E. coli O121 Contamination**, 31 de maio de 2016. Disponível em: < <http://www.wsj.com/articles/PR-CO-20160531-911562>>. Acesso em: 26 Jul. 2016.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical reviews**, v.96, n.4, p.1533-1554, 1996

VIEIRA, S. **Análise de variância**: (Anova). São Paulo: Atlas, 2006

WINK, T., ZUILEN, S.J., BULT, A., BENNEKOM, W.P. Self-assembled monolayers for biosensors. **The Analyst**, v.122, p. 43-50, 1997.

REFERÊNCIAS

WIRDE, M.; GELIUS, U. Self-Assembled Monolayers of Cystamine and Cysteamine on Gold Studied by XPS and Voltammetry. **Langmuir**, v.15, p. 6370-6378, 1999.

XIE, F.; YANG, H.; LI, S.; SHEN, W.; WAN, J.; JOHNSON, M.; WIKLE, H.; KIM, D.; CHIN, B. Amorphous magnetoelastic sensors for the detection of biological agents. **Intermetallics**, v. 17, n. 4, p. 270-273, 2009.

ZAVALA, G. Atomic force microscopy, a tool for characterization, synthesis and chemical processes: Review. **Colloid Polym Sci**, p. 85-95, 2008.

APÊNDICE

Quadro 1. Dados de rugosidade das superfícies rugosa, lisa e polida *as cast* dos sensores magnetoelástico.

	Superfície rugosa			Superfície lisa			Superfície polida		
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3
Ra (nm)	9,8	19,3	10,4	3,7	1,8	1,7	0,6	1,8	0,3
Rq (nm)	13,6	23,4	12,7	5,4	3,0	2,4	1,0	2,0	0,3
Rsk (nm)	1,05	0,18	0,32	-1,46	-0,72	0,18	-0,06	0,70	0,72

Quadro 2. Dados de rugosidade das superfícies rugosa, lisa e polida dos sensores magnetoelástico revestidas com Cr/Au pelo processo de *sputtering*.

	Superfície rugosa			Superfície lisa			Superfície polida		
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3
Ra (nm)	10,1	16,0	12,8	4,6	4,4	4,1	2,83	3,06	2,65
Rq (nm)	12,5	18,5	20	7,5	5,5	4,7	3,62	3,77	3,32
Rsk (nm)	0,47	0,17	1,06	1,13	0,44	0,42	-0,18	0,33	-0,07

Quadro 3. Dados de rugosidade das superfícies rugosa e lisa dos sensores magnetoelástico revestidas com Au pelo processo de eletrodeposição.

	Superfície rugosa			Superfície lisa		
	A1	A2	A3	A1	A2	A3
Ra (nm)	13,3	13,6	9,8	3,8	4,5	4,8
Rq (nm)	16,4	16,8	12,5	4,7	5,6	6,1
Rsk (nm)	0,87	0,94	0,96	0,22	0,13	-0,09

Quadro 4. Dados de rugosidade da superfície polida dos biossensores magnetoelásticos com deposição de CYS, MPA e CYSTE.

	Superfície com CYS			Superfície com MPA			Superfície com CYSTE		
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3
Ra (nm)	20,0	30,8	35,1	48,1	33,6	59,6	22,0	18,9	19,1
Rq (nm)	25,8	34,6	41,1	67,7	42,2	70,7	29,1	25	22,9
Rsk (nm)	0,62	0,05	-0,19	0,33	0,68	-0,77	0,09	0,04	0,08

APÊNDICE**Quadro 5.** Dados de variação de frequência de ressonância (Hz) para os biossensores testados com deposição de CYS.

Tempo (min)	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 4	Sensor 5
0	0,00	0	0	0	0
2	37,50	37,50	42,75	50,50	58,25
4	37,50	98,75	47,75	75,50	92,75
6	75,00	118,75	64,50	131,50	92,75
8	75,00	126,75	82,75	128,25	131,00
10	93,75	137,50	105,50	141,50	149,75
12	146,25	156,25	137,50	147,25	154,00
14	148,50	137,50	150,50	146,25	169,25
16	173,75	146,25	154,75	155,00	168,75
18	168,50	147,25	156,25	165,00	182,25
20	198,75	155,00	144,50	185,75	179,50
22	198,75	159,00	164,50	180,75	193,00
24	206,50	170,25	172,50	192,25	201,25
26	202,75	175,00	168,25	200,50	190,25
28	207,75	186,25	182,50	209,25	197,75
30	206,75	202,50	195,50	207,25	206,50
32	210,00	195,00	194,25	218,25	212,50
34	218,50	200,00	204,00	226,25	217,75
36	218,50	209,25	210,25	224,25	225,25
38	223,50	207,25	208,00	225,50	221,00
40	222,75	214,50	212,50	224,25	226,00
42	223,00	218,25	219,75	221,50	220,00
44	226,75	216,50	216,75	223,50	226,00
46	224,50	212,25	212,00	224,50	223,75
48	224,75	215,25	212,75	221,75	222,50
50	225,75	217,50	219,75	223,50	223,25
52	225,75	206,50	219,75	226,25	219,00
54	224,50	207,25	215,75	226,25	221,25
56	226,75	213,25	216,75	225,25	222,00
58	225,00	211,75	215,00	223,50	222,75
60	223,00	211,75	219,00	221,75	223,75

APÊNDICE**Quadro 6.** Dados de variação de frequência de ressonância (Hz) para os biossensores testados com deposição de MPA.

Tempo (min)	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 4	Sensor 5
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	47,25	50,00	50,00	31,25	62,50
4	68,75	76,67	56,25	25,00	68,75
6	148,50	120,00	62,50	43,75	343,75
8	187,50	175,00	137,50	31,25	287,50
10	200,00	216,67	100,00	50,00	287,50
12	206,25	225,00	118,75	50,00	275,00
14	225,00	250,00	125,00	50,00	268,75
16	257,50	258,33	175,00	68,75	287,50
18	287,50	250,00	212,50	68,75	287,50
20	300,00	275,00	193,75	62,50	268,75
22	306,25	300,00	212,50	56,25	268,75
24	306,25	300,00	225,00	68,75	287,50
26	325,00	291,67	231,25	56,25	268,75
28	306,25	300,00	250,00	87,50	287,50
30	300,00	300,00	250,00	181,25	268,75
32	306,25	300,00	256,25	275,00	281,25
34	306,25	300,00	237,50	256,25	287,50
36	306,25	300,00	268,75	262,50	287,50
38	306,25	300,00	256,25	275,00	281,25
40	300,00	325,00	281,25	275,00	287,50
42	312,50	325,00	268,75	275,00	293,75
44	325,00	300,00	268,75	268,75	306,25
46	306,25	300,00	268,75	262,50	306,25
48	318,75	300,00	268,75	275,00	306,25
50	325,00	300,00	256,25	275,00	325,00
52	343,75	300,00	281,25	268,75	325,00
54	325,00	300,00	268,75	275,00	343,75
56	325,00	300,00	268,75	275,00	343,75
58	325,00	300,00	268,75	287,50	343,75
60	325,00	300,00	268,75	293,75	362,50

APÊNDICE**Quadro 7.** Dados de variação de frequência de ressonância para os biossensores testados com deposição de CYSTE.

Tempo (min)	Sensor 1	Sensor 2	Sensor 3	Sensor 4	Sensor 5
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	63,33	62,50	56,25	60,17	68,75
4	100,83	93,75	75,00	75,67	84,38
6	105,00	109,38	93,75	93,75	99,96
8	130,00	125,00	127,83	131,25	135,63
10	138,33	130,21	131,25	133,75	141,63
12	145,50	140,42	150,00	150,00	144,79
14	162,50	159,38	168,75	168,75	159,38
16	173,50	167,67	171,83	175,75	184,38
18	204,17	193,63	187,50	187,50	185,63
20	217,50	200,54	206,25	187,50	200,00
22	233,83	212,00	210,08	212,50	215,63
24	253,83	239,79	246,25	243,75	246,88
26	244,17	261,67	246,83	256,25	246,88
28	257,50	257,71	256,00	262,50	257,29
30	270,83	267,71	269,00	272,50	274,79
32	270,83	267,42	275,33	273,58	273,75
34	262,50	273,25	268,75	260,33	275,63
36	270,50	269,17	270,00	260,08	274,17
38	262,00	272,83	268,75	264,17	275,63
40	268,33	273,75	270,83	257,50	274,29
42	262,50	273,75	275,50	267,50	274,17
44	264,67	269,17	270,83	265,83	265,29
46	259,67	259,38	270,50	267,50	264,13
48	267,00	261,67	265,25	265,00	271,25
50	262,50	261,04	262,50	265,00	276,88
52	262,50	256,88	257,92	265,00	276,88
54	261,83	267,00	272,58	263,75	273,96
56	270,50	266,88	267,50	263,75	262,50
58	260,83	269,17	267,67	257,08	267,71
60	260,00	269,17	267,67	257,08	262,50

ANEXO

Quadro 8. Reagentes e vidrarias utilizados nos ensaios de análise e quantificação de *E. coli* por biossensores magnetoelásticos.

Reagente / vidraria	Marca
1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC)	Sigma Aldrich
N-Hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS)	Sigma Aldrich
Ágar Powder	HIMEDIA
Alumina 0,05 µm	Arotec
Álcool Etílico	Sigma Aldrich
Cistamina dicloro	Sigma Aldrich
Cisteamina	Sigma Aldrich
Ácido Mercaptopropiônico	Sigma Aldrich
Cloreto de Potássio	Biosolve
Cloreto de Sódio	Sigma
Fosfato de Potássio Monobásico	Synth
Fosfato de Sódio Dibásico Heptahidratado	Synth
Metanol	Sigma
Peptone Bacteriological	HIMEDIA
Tryptone Type-1	HIMEDIA
Bécker (50 mL e 250 mL)	-
Erlenmayer (50 mL e 100 mL)	-
Placas de Petri (Ø 90mm)	-
Microtubos de reação (250 µL e 600 µL)	Eppendorf
Tubos para coleta de sangue (4 mL)	Hermes Pardini
Pinças metálicas	Vetus

Quadro 9. Equipamentos utilizados nos ensaios de análise e quantificação de *E. coli* por biossensores magnetoelásticos.

Equipamento	Marca
Analizador de rede E5061B	Agilent
Autoclave vertical	CS
Balança analítica AY220 max 220g d=0,1 mg	Shimadzu
Banho ultrassônico	genérico
Micropipetador 0,1:2 µL	Labmate
Micropipetador 2:20 µL	Labmate
Micropipetador 20:200 µL	Labmate
Micropipetador 100:1000 µL	Labmate
Microscópio de Imunofluorescência BX3 / BX53	Olympus
Microscópio Eletrônico de Varredura Mira 3	Tescan
Microscópio de Força atômica SPM 9700	Shimadzu
Vórtex modelo 38266	Didática