

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

BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO PARA A DETECÇÃO DE *Escherichia coli*

**André Luís Possan**

Caxias do Sul, 2015.

André Luís Possan

Biosensor magnetoelástico para detecção de *Escherichia coli*,  
dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Processo e Tecnologias da Universidade de  
Caxias do Sul, visando obtenção de grau de Mestre em  
Engenharia de Processos e Tecnologias, orientação de Frank P.  
Míssell e co-orientação de Mariana Roesch Ely.

Caxias do Sul, 2015.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

P856b Possan, André Luís, 1981-  
Biosensor magnetoelástico para detecção de *Escherichia coli* / André  
Luís Possan. - 2015.  
105 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2015.

Orientador: Prof.: Frank P. Missel ; co-orientador: Profa. : Mariana  
Roesch Ely.

1. *Escherichia coli*. 2. Ressonância magnética. I. Título.

CDU 2.ed.: 616-008.87

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Escherichia coli</i>	616-008.87
2. Ressonância magnética	616-073

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

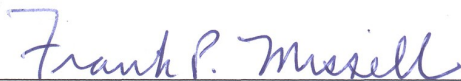
“BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO PARA DETECÇÃO DE ESCHERICHIA  
COLI.”

**André Luis Possan**

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, 27 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora:



Dr. Frank Patrick Missell (Orientador)  
Universidade de Caxias do Sul – (UCS)


\_\_\_\_\_  
Dra. Mariana Roesch Ely (Coorientadora)  
Universidade de Caxias do Sul – (UCS)



Dr. Antonio Domingues dos Santos  
Universidade de São Paulo – (IFUSP)



\_\_\_\_\_  
Dr. Aldo José Pinheiro Dillon  
Universidade de Caxias do Sul – (UCS)



\_\_\_\_\_  
Dr. Gunther Johannes Lewczuk Gerhardt  
Universidade de Caxias do Sul – (UCS)

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Frank P. Míssell, orientador, pela enorme atenção cedida em todos os momentos do desenvolvimento dos biosensores, tanto na elaboração deste estudo quanto aos recursos providos para a sustentação do mesmo.

À professora Dr<sup>a</sup>. Mariana Roesch Ely, co-orientadora, pelas sugestões valiosas no desempenho e construção dos biosensores, também pela atenção dada e recursos laboratoriais essenciais.

À Marcele Ulian Triaca, bolsista de iniciação científica, pela ajuda nos trabalhos laboratoriais e sugestões nos desenvolvimentos do dia-a-dia.

Aos colegas de laboratório Mateus Beltrami e Caroline Menti, pelo suporte técnico na resolução dos problemas relacionados ao estudo.

Ào coordenador do PGEPROTEC, professor Dr. Ademir Zattera, por ter confiado uma bolsa de estudos no projeto desenvolvido.

À Capes e SCIT pelos recursos providos para o desenvolvimento do projeto.

À Claudia Tormes, que no início do mestrado forneceu todas as informações necessárias para começar com excelência no projeto.

À Shandale E. Cappelari, pelo companheirismo do dia-a-dia, sempre apoiando e convivendo comigo.

Aos meus pais, Atalêmico Domingos Possan e Eliza Galvan Possan, pelo incentivo e confiança.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do projeto e minha vida acadêmica, vos saúdo agradecendo a contribuição.

*“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes”.*

*Isaac Newton*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
3.1 SENSORES MAGNETOELÁSTICOS: CONSTRUÇÃO, FUNÇÃO E APLICAÇÃO ..	22
3.2 <i>Escherichia coli</i> E DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR.....	29
3.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS .....	33
<b>3.3.1 Método PCR</b> .....	33
<b>3.3.2 Método ELISA</b> .....	34
<b>3.3.3 Método de Cultura</b> .....	35
3.4 CORTE DIMENSIONAL E DEPOSIÇÃO DE Cr/Au.....	36
<b>3.4.1 Corte dimensional</b> .....	36
<b>3.4.2 Deposição de Cromo e Ouro</b> .....	37
3.5 BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO E SISTEMA DE LEITURA .....	38
<b>3.5.1 O biosensor magnetoelástico</b> .....	38
<b>3.5.2 Sistema de leitura de biosensores magnetoelásticos</b> .....	40
3.6 CAMADAS AUTO-ORGANIZÁVEIS DE CISTAMINA E OS ANTICORPOS NA FORMAÇÃO DE BIOCONJUGADOS.....	41
<b>3.6.1 A formação de camadas auto-organizáveis de tiolatos</b> .....	41
<b>3.6.2 A cistamina para formação de SAM</b> .....	43
<b>3.6.3 Formação de bioconjugados</b> .....	45
3.6.3.1 <i>A estrutura do anticorpo</i> .....	45
3.6.3.2 <i>A junção entre a Cistamina e o anticorpo intermediada pela reação Carbodiimida</i> ..	46
3.7 SISTEMA DE ANÁLISE DE BACTÉRIAS POR BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO E CONTAMINAÇÃO .....	50
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	52
<b>4.1.1 Reagentes e vidrarias</b> .....	52
<b>4.1.2 Equipamentos</b> .....	52
<b>4.1.3 Meio de cultura</b> .....	52

4.1.4 Cepas de bactérias.....	53
4.1.5 Anticorpos primário e secundário .....	53
4.1.6 Liga amorfa magnetoelástica .....	53
4.2 CARACTERIZAÇÕES.....	53
4.2.1 Microscopia.....	53
4.2.2 Análise química por FTIR.....	54
4.2.3 Análise das frequências de ressonância .....	54
4.2.4 Contagem das bactérias .....	56
4.2.5 Polimento de sensores .....	56
4.3 METODOLOGIA .....	57
4.3.1 Fluxograma do processo de fabricação dos biosensores e análise das frequências de ressonância das contaminações .....	57
4.3.2 A escolha do tipo de sensor magnetoelástico .....	58
4.3.3 Corte em micro serra da fita magnetoelástica para dimensionamento dos sensores magnetoelásticos .....	58
4.3.4 Deposição das camadas de Cr e Au sobre o sensor magnetoelástico.....	58
4.3.5 Armazenamento dos sensores magnetoelásticos .....	59
4.3.6 Formação da SAM com soluções de cistamina.....	59
4.3.7 Aplicação do anticorpo sobre as SAM de cistamina.....	59
4.3.8 Análise das frequências de ressonância .....	60
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
5.1 AVALIAÇÃO DOS SENSORES MAGNETOELÁSTICOS E AJUSTES DE PONTO DE OPERAÇÃO.....	61
5.2 A PRODUÇÃO DO BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO, CONTAMINAÇÃO E AVALIAÇÕES DE DESEMPENHO .....	69
5.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS SUPERFÍCIES DOS BIOSENSORES CONTAMINADOS.....	87
5.4 LIMITES DE DETECÇÃO .....	92
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de sensibilidade de massa variando os comprimentos e mantendo a espessura em 30 $\mu$ m, juntamente com a frequência de ressonância fundamental de cada dimensão específica .....	27
Tabela 2 - Comparativo entre os métodos de detecção e quantificação de bactérias utilizados em ambientes voltados à biossegurança, ambiente hospitalar e setor alimentício .....	33
Tabela 3 - Massa mínima detectável e número mínimo de bactérias detectáveis. Dados gerados através das Equações 7 e 8, variando p comprimento (L) e largura (W) e mantendo a espessura do sensor em 30 $\mu$ m, juntamente com $f_o$ e $S_m$ de cada dimensão específica. ....	39
Tabela 4 - Variação máxima de $\Delta f$ para a compactação máxima de bactérias E. coli sobre a superfície do biosensor magnetoelástico. ....	51
Tabela 5. Valores de rugosidade da superfície da fita magnetoelástica mostrando os parâmetros Ra, Ry e Rz. ....	66
Tabela 6. Coleta de dados de $\Delta f$ informando as variações dos 5 biosensores lisos testados nas mesmas condições de montagem e contaminação. ....	76
Tabela 7. Valores de $\Delta f$ convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão lisa de biosensor utilizado nos ensaios de detecção e quantificação. ....	77
Tabela 8. Coleta de dados de $\Delta f$ informando as variações dos 5 biosensores rugosos testados nas mesmas condições de montagem e contaminação. ....	80
Tabela 9. Valores de $\Delta f$ convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão rugosa de biosensor utilizado nos ensaios de detecção e quantificação. ....	82
Tabela 10. Coleta de dados de $\Delta f$ informando as variações dos 5 biosensores polidos testados nas mesmas condições de montagem e contaminação. ....	83
Tabela 11. Valores de $\Delta f$ convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão polida de biosensor utilizado nos ensaios de detecção e quantificação. ....	85
Tabela 12. Limites de detecção em nanogramas em 1 mL, para as superfícies dos biosensores testados. ....	92

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sensor magnetoelástico utilizado como dispositivo de segurança comercial.....	22
Figura 2. Frequência de ressonância de sensores em função do comprimento respeitando a relação 5:1 com a largura. Os pontos mostram valores de calibração de sensores com diferentes comprimentos em relação aos dados teóricos plotados .....	23
Figura 3. Esquema que demonstra o sistema de excitação e captação do sinal para o sensoriamento wireless, com o uso de sensor magnetoelástico.....	24
Figura 4. Medidas de frequência de ressonância de um sensor magnetoelástico com dimensão de 30 mm x 5 mm x 30 µm em função do campo magnético aplicado. O ponto de operação está em torno de 6 Oe (Oersted) onde a amplitude é máxima .....	24
Figura 5. Amplitude e frequência de ressonância em diferentes meios de análise em sensor magnetoelástico de 1 mm x 0,2 mm x 30 µm. O amortecimento sugerido foi de 37% em meio aquoso.....	25
Figura 6. Sensitividade de massa de sensores magnetoelásticos em função do comprimento. A linha azul corresponde a dados teóricos de um sensor de 15 µm de espessura e a linha preta corresponde aos dados teóricos de um sensor de 30 µm de espessura .....	28
Figura 7. Colônias de E. coli utilizada em ensaios de detecção e quantificação.....	29
Figura 8. Registro da E. coli O157:H7 sobre folha de alface, feita por microscopia confocal de fluorescência.....	30
Figura 9. Micrografia eletrônica de aglomerado de bactérias E. coli.....	31
Figura 10. Curvas de crescimento de diferentes cepas de E. coli em meio de nutrientes específico .....	31
Figura 11. Método de ELISA para detectar quantidades de proteínas na ordem de nano gramas .....	34
Figura 12. Streak plate de colônia específica na superfície de uma placa de cultura para a verificação de tamanho, cor e textura.....	35
Figura 13. Spread plates de contagem de bactérias em 5 diluições a partir de cultivo em meio líquido, após crescimento de 40 horas a 25°C.....	36
Figura 14. Sistema de corte Microdicing-saw para corte de peças com dimensões precisas....	37
Figura 15. Tipos de biosensores e elementos de reconhecimento biomolecular comumente usados para detecção de patógenos nas áreas de biossegurança, hospitalar e alimentícia .....	38
Figura 16. Sistema de leitura de frequências de ressonância de biosensores magnetoelásticos composto por Analisador de Redes e pick-up coil .....	40

Figura 17. Estrutura das monocamadas auto organizáveis em superfície de biosensores.....	42
Figura 18. Formação da SAM mostrando as etapas de formação compostas por rápida adsorção (a), seguida de processo de crescimento lento (b) e pôr fim a formação de auto camada organizada (c) .....	43
Figura 19. FTIR da cistamina mostrando o desdobramento molecular N-H em torno de 3500 cm-1, em específico para eletrodos cobertos com Au em análise eletroquímica .....	44
Figura 20. Formação da SAM sobre superfície de Au com uso de CYS dissolvida em Etanol .....	44
Figura 21. Anticorpo (azul claro) acoplado em antígeno celular. ....	45
Figura 22. Regiões do anticorpo que mostram a ligação com o antígeno e com cistamina, conhecidas como regiões Fab e Fc .....	46
Figura 23. Derivações de ácidos carboxílicos que podem ser preparados através do uso de intermediários ativos que reagem com um grupo alvo funcional para formação de produtos acilatos .....	47
Figura 24. Reação de conjugação de grupo carboxilato, EDC e cistamina com o anticorpo formando uma proteína marcada com cistamina na superfície de sensor magnetoelástico .....	49
Figura 25. Biosensor magnetoelástico em fase de contaminação para análise de detecção e quantificação de bactérias.....	50
Figura 26. Medida de ressonância de sensor magnetoelástico de dimensão 5 mm x 1 mm, mostrando o marcador 3 no pico de frequência de ressonância .....	55
Figura 27. Bobina de Helmholtz para leitura de sensores usando Lock-in e fonte .....	55
Figura 28. Pick-up coil para análise de frequência de ressonância em meio líquido, suportando Eppendorf de 250 µL.....	56
Figura 29. Sensores magnetoelásticos com camadas Cr e Au armazenados em dessecador para evitar umidade e corrosão.....	59
Figura 30. Corte da fita amorfa magnetoelástica (dimensões 5 mm x 1 mm e 2 mm x 0,4 mm) processada em serra microdicing saw e suportada em substrato polimérico de cura UV .....	61
Figura 31. Comparativo entre tipos de corte. A primeira micrografia mostra um sensor com corte a laser e o segundo cortado por serra microdicing saw .....	61
Figura 32. Espectro RBS das camadas de Cr e Au depositadas sobre superfície de Silício (Instituto de Física da Universidade de São Paulo .....	62
Figura 33. Comparativo entre as 3 superfícies testadas nas montagens dos biosensores. A coluna “a” representa o sensor liso, a coluna “b” representa o sensor rugoso e a coluna “c” representa o sensor polido.....	63

Figura 34. Comparativo entre as 3 superfícies testadas nas montagens dos biosensores, com imagens ajustadas para fundo plano. ....	64
Figura 35. Avaliação da superfície da fita magnetoelástica em rugosímetro .....	65
Figura 36. Avaliações de frequências de ressonância de sensores magnetoelásticos .....	67
Figura 37. Frequências de ressonância e o delta da amplitude em função da DC bias .....	68
Figura 38. Variações de frequências de ressonância e amplitude em ar e em diferentes meios líquidos de análise, avaliadas no sensor liso .....	69
Figura 39. Crescimento característico da E. coli ATCC 25922 com concentração de $6,9 \cdot 10^8$ UFC mL <sup>-1</sup> após 14 horas em meio LB.....	70
Figura 40. Espectro de FTIR das superfícies com aplicação de CYS (concentração de 20 mM) para a formação da SAM.....	71
Figura 41. Micrografia FEG da superfície de sensor polido e coberto com Cr e Au. ....	72
Figura 42. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 30 minutos e magnificação de 4000 vezes. ....	73
Figura 43. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 30 minutos e magnificação de 27600 vezes. ....	73
Figura 44. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 120 minutos e magnificação de 4000 vezes. ....	74
Figura 45. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 120 minutos e magnificação de 26600 vezes. ....	75
Figura 46. Curvas de $\Delta f$ dos 5 biosensores de superfície lisa, juntamente com o sensor branco .....	76
Figura 47. Avaliação da taxa de ligação entre a E. coli e a superfície do biosensor magnetoelástico. ....	78
Figura 48. Avaliação Sigmoidal Logistic para as taxas de ligação entre E. coli e a superfície do biosensor magnetoelástico de superfície lisa.....	79
Figura 49. Curvas de $\Delta f$ dos 5 biosensores de superfície rugosa, juntamente com o sensor branco .....	81
Figura 50. Avaliação Sigmoidal Logistic para as taxas de ligação entre E. coli e a superfície do biosensor magnetoelástico de superfície rugosa.....	82

Figura 51. Curvas de $\Delta f$ dos 5 biosensores de superfície polida, juntamente com o sensor branco .....	84
Figura 52. Avaliação Sigmoidal Logistic para as taxas de ligação entre E. coli e a superfície do biosensor magnetoelástico de superfície polida .....	86
Figura 53. Sequência de camadas que envolvem a composição do biosensor, contaminação e a fluorescência .....	87
Figura 54. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície lisa em campos diferentes .....	88
Figura 55. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície lisa .....	88
Figura 56. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície rugosa .....	89
Figura 57. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície polida.....	90
Figura 58. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície polida em campos diferentes .....	90
Figura 59. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície polida.....	91

## ANEXOS

### ANEXO I

Quadro 1 - Reagentes e vidrarias utilizados nos ensaios de crescimento de bactérias, limpeza de biosensores e análise e quantificação de bactérias por biosensores magnetoelásticos. ....	96
Quadro 2 - Equipamentos utilizados na produção de biosensores e caracterização.....	97

## NOMENCLATURAS

Ac – Anticorpos

AC – Corrente contínua

AR – Analisador de Redes

Au – Ouro

BSA - *Bovine Serum Albumin*

Cr – Cromo

CTI - Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer

CYS – Cistamina

DC – Corrente alternada

*E. coli* – *Escherichia coli*

EDC – Carbodiimida

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

H – Hidrogênio

IFUSP - Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Kg – Quilograma

kV – Quilovolts

LB – Meio Luria Bertani

LCM – Laboratório de Caracterização Magnética

LIQ – Meio líquido

LPGRD – Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mM – Milimolar

N – Nitrogênio

nm – Nanômetros

PBS - *Phosphate Buffer Saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pg – Picograma

RBS - *Rutherford Backscattering Spectroscopy*

rpm – Rotação por minuto

S – Enxofre

SAM – *Self Assembled Monolayers*

SS – Meio semissólido

UFC – Unidades formadoras de colônias

UV – Ultravioleta

µm – Micrometros



## RESUMO

A *Escherichia coli* é uma bactéria que deve ser controlada na indústria alimentar e setor hospitalar. Biosensores magnetoelásticos oferecem a promessa de rápida identificação destes e de outros patógenos prejudiciais. Neste trabalho, tiras amorfas de Metglas 2826MB3 foram cortadas ao tamanho 5 mm x 1 mm, com uma serra de micro corte e, em seguida, foram revestidas com camadas finas de Au e Cr, como foi verificado pela análise de espessuras de filmes *Rutherford Backscattering Spectroscopy* (RBS). Foram estudadas várias superfícies dos sensores: 1) sensor *as-cast*, lado roda; 2) sensor *as-cast*, superfície livre; 3) superfície polida. Uma camada de cistamina (CYS) foi aplicada ao substrato magnetoelástico, formando monocamadas auto organizadas (SAM), seguido de anticorpos, utilizando um protocolo modificado de Hermanson. Foi utilizado a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, um anticorpo primário anti *E. coli* para a formação do bioconjugado e um anticorpo secundário *Goat IgG anti-rabbit H&L Alexa Fluor 488* para a microscopia de fluorescência por método imunológico. O crescimento da camada de cistamina foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as superfícies. Os biosensores foram expostos a soluções de bactérias e a frequência de ressonância dos sensores foi medida com um analisador de impedância Agilent E5061B até 100 minutos, em 5 biosensores de cada tipo. As reduções na frequência de ressonância, que apresentam a captura de bactérias, foram medidos após a otimização da amplitude do sinal. Para tempos até 40 minutos, a altas taxas de captação foram observadas e, posteriormente, a saturação ocorreu. Os parâmetros associados com uma cinética de captura foram estudados para diferentes superfícies dos sensores. O sensor com uma superfície polida mostrou melhores resultados. Este trabalho mostra que os biosensores magnetoelásticos podem ser úteis para a detecção e quantificação de microrganismos.

Palavras-chave: Biosensor, Cistamina, Frequência, *Escherichia coli*, Anticorpos.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is a bacteria that must be controlled in the food industry and the hospital sector. Magnetoelastic biosensors offer the promise of rapid identification of these and other harmful pathogens. In this work, strips of amorphous Metglas 2826MB3 were cut to size (5 mm x 1 mm) with a micro-dicing saw and were then coated with thin layers of Cr and Au, as verified by Rutherford backscattering spectroscopy (RBS). Several sensor surfaces were studied: 1) as-cast strip, wheel side; 2) as-cast strip, free surface; 3) thinned and polished surface. A layer of Cystamine (CYS) was applied to the magnetoelastic substrate, forming a self-assembled monolayer (SAM), followed by antibodies, using a modified Hermanson protocol. For our *Escherichia coli* ATCC 25922, we used both a primary antibody anti *E. coli* and a secondary antibody Goat anti Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488. The cystamine layer growth was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The biosensors were exposed to solutions of bacteria and the resonant frequency of the sensors was measured with an Agilent E5061B impedance analyzer for times up to 100 minutes. Reductions in the resonant frequency, corresponding to bacteria capture, were measured after optimizing the signal amplitude. For times up to 40 minutes, high capture rates were observed and thereafter saturation occurred. Parameters associated with capture kinetics were studied for different sensor surfaces. The sensor with a polished surface was found the best results. This work shows that magnetoelastic biosensors may be useful for the detection and quantification of microorganisms.

Keywords: Biosensors, cystamine, Frequency, *Escherichia coli*, Antibody.

# 1 INTRODUÇÃO

A detecção da presença e quantidade de patógenos, nos mais diversos materiais, é feita por métodos que requerem enorme quantidade de tempo. Para deixar o processo seguro e em tempo real, há necessidade de técnicas diferenciadas de detecção e quantificação dos organismos patogênicos como a bactéria *Escherichia coli* (ERTL *et al.*, 2003).

A *Escherichia coli* é umas das bactérias controladas nos setores hospitalar e alimentício. A falta de controle deste microrganismo pode desencadear o surgimento de doenças no organismo humano, que ocorrem, muitas vezes, pelo consumo de água contaminada ou falta de higienização dos setores. Uma rápida detecção e quantificação é requerida nos ambientes que possuem controle de patógenos e métodos mais rápidos são necessários (LIU *et al.*, 2013).

Para a detecção e quantificação de bactérias em tempo real, há necessidade de produção de um biosensor *wireless*. A escolha de um sensor magnetoelástico que possibilite uma resposta de sinal elétrico é essencial para o sistema de leitura, pois opera como transdutor. Os sensores magnetoelásticos são comumente utilizados como marcadores antifurto, e estão no comércio em geral. Os biosensores são compostos de liga amorfa que possui propriedades magnéticas propícias para o uso em sensoriamento e medição de frequências de ressonância (GRIMES *et al.*, 2011).

O corte dimensional mostra ser um outro fator importante pois o tamanho varia a sensibilidade. Para aplicar um método imunológico de detecção, o sensor magnetoelástico é coberto com camadas que formarão as ligações de atração das bactérias na superfície. A aplicação de Cromo e Ouro inicialmente remete à possibilidade de ligação com um composto orgânico chamado cistamina e a formação das camadas auto – organizáveis na superfície do sensor magnetoelástico (RUAN *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2011).

Em seguida, a escolha de um anticorpo relacionado com o patógeno alvo é umas das partes do método de maior importância pois fará especificamente a ligação com a bactéria que se apresenta no meio contaminante (YANG e LI, 2005).

Provendo um sistema de leitura que mede frequências de ressonância a partir da mudança de massa atraída pela superfície do biosensor, são possíveis a detecção de uma bactéria específica e a quantificação da mesma. Desta forma, a detecção e quantificação de um microrganismo específico pode ser realizada em menor tempo de análise em comparação a métodos utilizados nos laboratórios clínicos e industriais (LEE *et al.*, 2014).

## **1 INTRODUÇÃO**

---

O uso de biosensores magnetoelásticos somado a um método imunológico de atração de bactérias, é sugerido para a detecção e quantificação dos organismos patogênicos existentes a nível de saúde humana e animal, em tempo real.

No Brasil há estudos de técnicas de sensoriamento de diversas formas, entretanto, por meio de sensores magnetoelásticos a proposta é inovadora.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de biosensor magnetoelástico para a detecção e quantificação de patógenos em tempo real, para casos específicos da bactéria *Escherichia coli*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dimensionamento do sensor magnetoelástico e deposição de Cr/Au;
- Aplicação de camadas auto-organizáveis de cistamina sobre o sensor para ligação com anticorpo específico e a formação de bioconjugados;
- Detecção e quantificação da bactéria *Escherichia coli*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SENSORES MAGNETOELÁSTICOS: CONSTRUÇÃO, FUNÇÃO E APLICAÇÃO

Os sensores magnetoelásticos são comumente dimensionados em finas tiras com variadas medidas de comprimento. É comum encontrar este tipo de fita em supermercados e afins, sendo utilizado como dispositivo marcador antifurto (Figura 1)(GRIMES *et al.*, 2011).

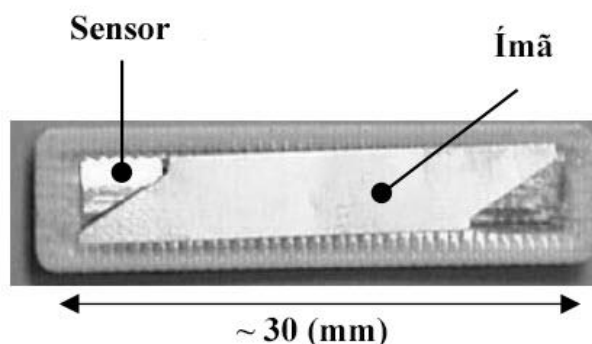


Figura 1. Sensor magnetoelástico utilizado como dispositivo de segurança comercial (HERZER, 2003).

Fabricado pelo processo de *Melt Spinning*, a composição do sensor é variável dependendo da aplicação, entretanto, a estrutura é amorfa. Esse processo de fabricação apresenta diferentes rugosidades para os lados da fita: o lado inferior voltado para a roda de conformação e a parte superior voltada para o ambiente. Desta forma, o lado inferior voltado para a roda aprisiona bolhas de ar tornando a topografia rugosa, ao contrário da parte superior que é lisa. Proveniente da empresa americana Metglas, a liga amorfa magnetoelástica é composta usualmente de Fe(45%)Ni(45%)Mo(7%)B(3%) (Metglas 2826MB3), possui magnetoestricção de saturação de 12 ppm, tem módulo de Young em torno de 105GPa, razão de Poisson de 0,33 e massa específica de  $7900 \text{ Kg.m}^{-3}$ . A dimensão das tiras varia de acordo com a aplicação e para sensores são utilizadas tiras de 30 mm a 0,5 mm de comprimento, respeitando sempre a relação de 5:1 entre o comprimento (L) e largura (W). A espessura é de 30 micrometros para o sensor sem tratamento (*as cast*). Quando o sensor magnetoelástico é excitado por um campo magnético, produz vibrações longitudinais que gera ondas elásticas do centro para os extremos. Essas ondas elásticas produzem ressonância e podem ser detectadas de forma magnética, acústica ou óptica. A frequência fundamental ( $f_0$ ) a que a fita magnetoelástica ressona é dependente do comprimento (Figura 2), do módulo de elasticidade (E) e de massa específica ( $\rho$ ) da composição utilizada, como é mostrado na Equação 1

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

(Hristoforou e Ktena (2007); WEN *et al.*, 2010; METGLAS, 2011; SOWJANYA e KISHEN KUMAR REDDY, 2014).

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

(1)

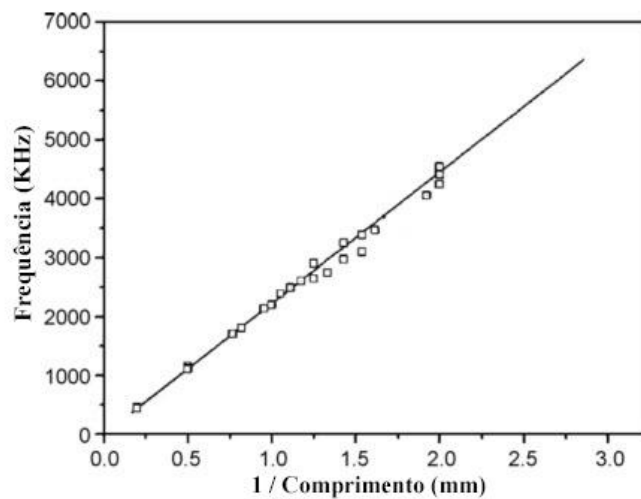


Figura 2. Frequência de ressonância de sensores em função do comprimento respeitando a relação 5:1 com a largura. Os pontos mostram valores de calibração de sensores com diferentes comprimentos em relação aos dados teóricos plotados (SHEN *et al.*, 2009).

Schmidt e Grimes (2001) mostram que as oscilações mecânicas em um sensor magnetoelástico podem ser promovidas através de um campo magnético externo. Essas oscilações causam mudanças no fluxo magnético devido ao efeito magnetoelástico inverso. Essa alteração de fluxo magnético e juntamente com as oscilações mecânicas, podem ser captadas através de uma bobina (*pick-up coil*) o que promove o sistema de sensoriamento *wireless* (Figura 3).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

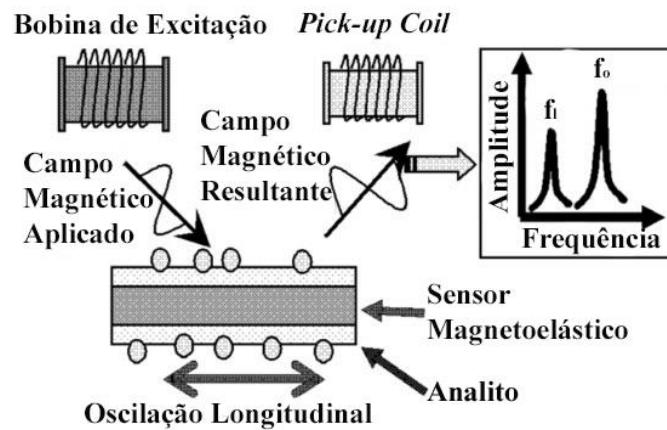


Figura 3. Esquema que demonstra o sistema de excitação e captação do sinal para o sensoriamento wireless, com o uso de sensor magnetoelástico (HUANG et al., 2008).

O campo magnético aplicado (tensão DC bias) determina o ponto de operação no sistema de leitura e a captação da frequência de ressonância do sensor magnetoelástico. Sensores de diferentes tamanhos possuem pontos de operação diferentes e para um sensor de mesma dimensão e com diferentes aplicações de campo magnético, apresentam diferentes respostas na frequência de ressonância. Essa variação na frequência de ressonância é comumente relacionada ao efeito  $\Delta E$ , pois o módulo de elasticidade é dependente do estado de magnetização do sensor. Variando a DC bias (Figura 4) é verificado o ponto de maior amplitude na ressonância, e este, é o ponto de operação para a verificação da frequência de ressonância pontual (CULLITY, 2011; GRIMES *et al.*, 2011).

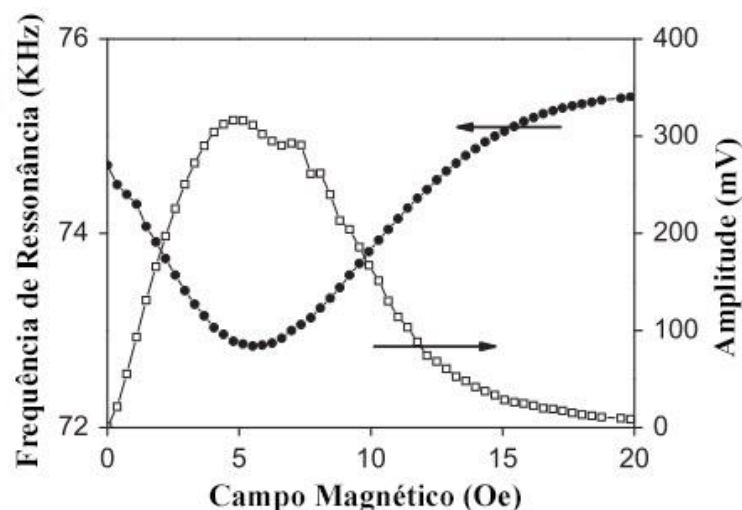


Figura 4. Medidas de frequência de ressonância de um sensor magnetoelástico com dimensão de 30 mm x 5 mm x 30  $\mu$ m em função do campo magnético aplicado. O ponto de operação está em torno de 6 Oe (Oersted) onde a amplitude é máxima (TORMES et al., 2014).



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Wen *et al.* (2010) salientam que dependendo do meio de análise ao qual o sensor magnetoelástico está exposto, forças de amortecimento afetam a superfície. Essas forças de amortecimento reduzem a frequência de ressonância do sensor magnetoelástico pois impedem as oscilações vibracionais, mudando o comportamento (Figura 5).

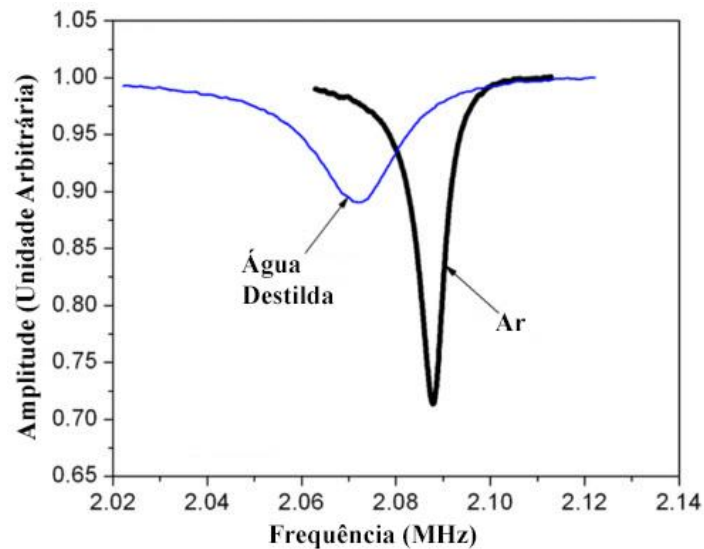


Figura 5. Amplitude e frequência de ressonância em diferentes meios de análise em sensor magnetoelástico de 1 mm x 0,2 mm x 30  $\mu$ m. O amortecimento sugerido foi de 37% em meio aquoso (WEN *et al.*, 2010).

Outro ponto a ser considerado é o fator de qualidade do sensor magnetoelástico (*Q-factor*). O amortecimento causado pelo meio aquoso reduz o *Q-factor* dos sensores magnetoelásticos. O *Q-factor* reflete na perda de energia durante o processo de transferência da energia magnética para a energia mecânica e pode ser calculado através da medida de frequência máxima (pico) e dividida pela variação média (valores de frequência) entre a meia altura do pico (WU *et al.*, 2010).

Jain *et al.* (2001) e Shen (2011) mostram que um dos efeitos mais interessantes que envolvem o uso do sensor magnetoelástico é o amortecimento causado por um carregamento de massa uniformemente aplicada na superfície do sensor magnetoelástico. Esse amortecimento muda a frequência de ressonância e é inversamente proporcional ao aumento de massa (Kg). Para um sensor de massa  $m_0$  e frequência de ressonância  $f_0$ , a mudança da frequência de ressonância causada pelo aumento de massa na superfície é regido pela Equação 2.

$$\Delta f = -\frac{f_0 \Delta m}{2 m_0}$$

(2)

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Sendo que a frequência de carregamento de massa é correspondida por  $fl$ .

$$\Delta f = fl - fo \quad (3)$$

A relação entre o aumento de massa e a mudança de frequência de ressonância é chamada de sensibilidade de massa ( $S_m$ ) do sensor magnetoelástico, definida pela mudança de frequência causada por unidade de massa sobre o sensor (Equação 4).

$$S_m = -\frac{df}{dm} \quad (4)$$

Substituindo as equações (1) e (2) na equação (4), obtemos a  $S_m$  (5) relacionada com as propriedades do sensor magnetoelástico e suas dimensões. A partir desta equação é possível fazer considerações sobre a dimensão, variando a espessura ( $t$ ) e comprimento ( $L$ ). É considerado o coeficiente de Poisson ( $\sigma$ ) indicado por Alekna *et al.* (1998), e o valor comumente aplicado na liga METGLAS 2826MB3 é de 0,33, de acordo com Liang *et al.* (2007). A Equação 5 mostra a sensibilidade de massa.

$$S_m = -\frac{1}{4\rho L^2 W t} \sqrt{\frac{E}{\rho(1-\sigma)}} \quad (5)$$

Uma vez que a relação dimensional entre  $L$  e  $W$  é mantida na proporção de 5:1 ( $L = 5W$ ), a Equação 5 é ajustada para a Equação 6.

$$S_m = -\frac{5}{4\rho L^3 t} \sqrt{\frac{E}{\rho(1-\sigma)}} \quad (6)$$

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De acordo com a equação (6), notamos que  $S_m$  é determinada pelo comprimento e espessura do sensor magnetoelástico. Desta forma, uma redução na espessura e especialmente no comprimento do sensor (Tabela 1), agregaria alta sensibilidade na detecção de massa (Figura 6).

Tabela 1 - Dados de sensibilidade de massa variando os comprimentos e mantendo a espessura em  $30\mu\text{m}$ , juntamente com a frequência de ressonância fundamental de cada dimensão específica (Equações 1 e 6).

Dimensão			Frequência Fundamental	Sensibilidade de Massa
L (m)	W (m)	t (m)	$f_0$ (Hz)	$S_m$ (Hz.pg <sup>-1</sup> )
0,001	0,0002	0,000030	2226967	2,35E-02
0,002	0,0004	0,000030	1113483	2,94E-03
0,003	0,0006	0,000030	742322	8,70E-04
0,004	0,0008	0,000030	556742	3,67E-04
0,005	0,0010	0,000030	445393	1,88E-04
0,006	0,0012	0,000030	371161	1,09E-04
0,007	0,0014	0,000030	318138	6,85E-05
0,008	0,0016	0,000030	278371	4,59E-05
0,009	0,0018	0,000030	247441	3,22E-05
0,010	0,0020	0,000030	222697	2,35E-05

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

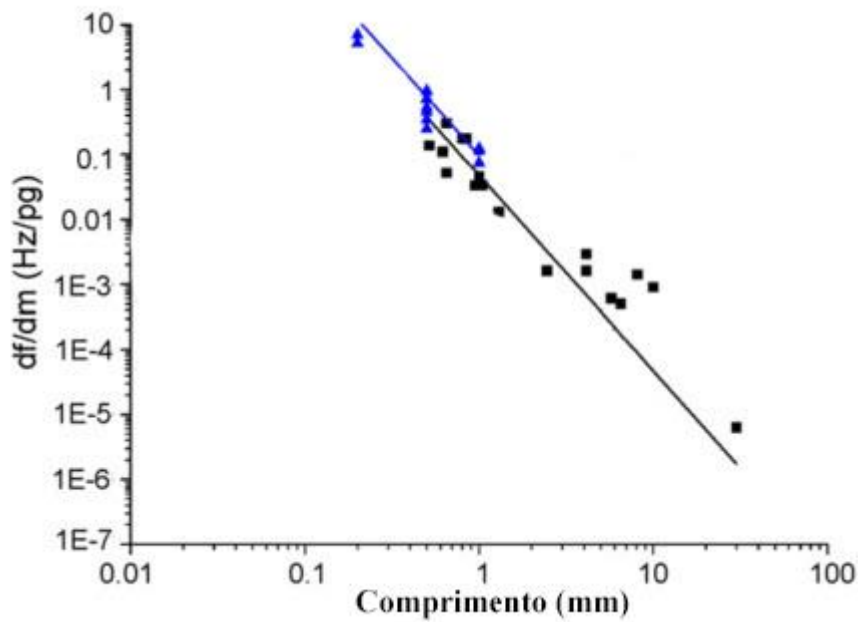


Figura 6. Sensibilidade de massa de sensores magnetoelásticos em função do comprimento. A linha azul corresponde a dados teóricos de um sensor de 15  $\mu\text{m}$  de espessura e a linha preta corresponde aos dados teóricos de um sensor de 30  $\mu\text{m}$  de espessura (SHEN et al., 2009).

A utilização de um sensor que detecte pequenas massas (picogramas) e que possua sensibilidade para partículas biológicas em dimensões micrométricas, mostra-se como uma alternativa para métodos de detecção e medição de pequenas massas comumente usados. Entretanto, há necessidade de montagem uma dimensional (corte) de boa qualidade e que a superfície do sensor magnetoelástico seja funcionalizável para bactérias.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.2 *Escherichia coli* E DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR

A *E. coli* é geralmente encontrada no trato intestinal humano e de animais (Figura 7). Em casos que não envolvem o trato intestinal, a *E. coli* é normalmente utilizada como indicador de contaminação quando detectados coliformes fecais em águas e alimentos. Conhecida como uma bactéria oportunista, também é chamada de patógeno facultativo, podendo causar peritonite (infecção na membrana serosa que reveste parte da cavidade abdominal e vísceras), infecções no trato urinário e acometer pacientes com imunossupressão (baixa imunidade). Cepas como as enteropatogênicas, enteroinvasivas e as enterohemorrágicas que são capazes de causarem diarreia também são conhecidas. Essas infecções estão relacionadas com a poluição de águas de abastecimento, hospitais e produtos da indústria alimentícia (PERCIVAL e WILLIAMS, 2014).

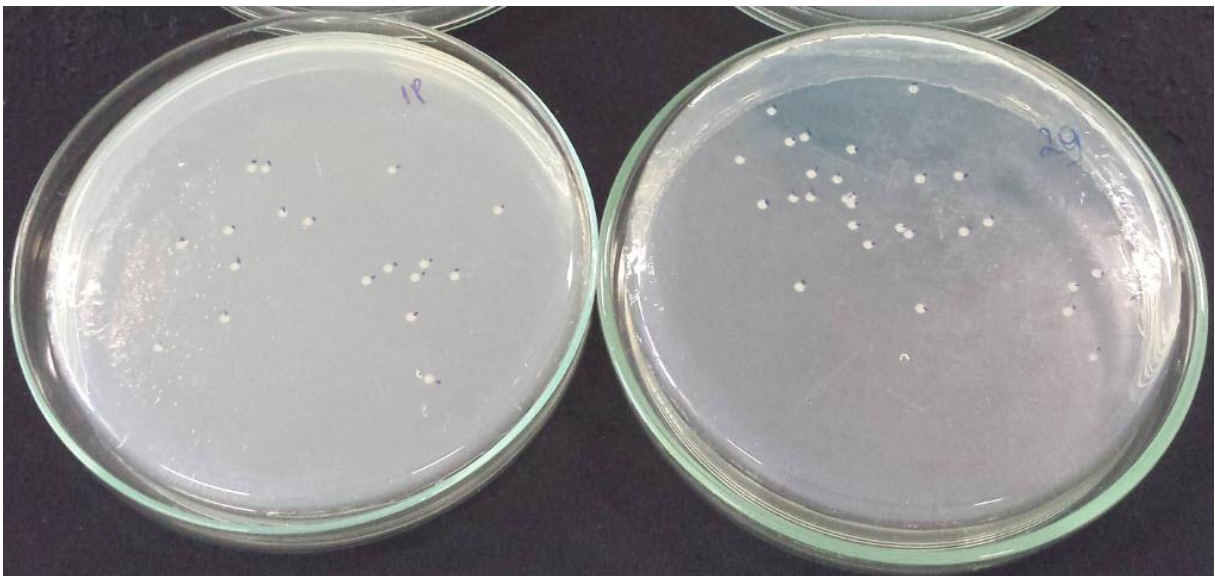


Figura 7. Colônias de *E. coli* utilizada em ensaios de detecção e quantificação (O autor).

Como a *Salmonella spp.*, a *E. coli* também pode estar presente em alimentos frescos como verduras e frutos (Figura 8). Esses alimentos são veículos potenciais para a *E. coli* e as doenças que podem ser transmitidas. Dados recentes mostram que todo ano 76 milhões de pessoas são contaminadas por *E. coli* através de água e alimentos, sendo que 12% desses casos estão ligados diretamente a alimentos frescos. Os incidentes com *E. coli* também são correlacionados com as condições climáticas, que facilitam o seu rápido crescimento em certas regiões (OLAIMAT e HOLLEY, 2012; LIU *et al.*, 2013).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

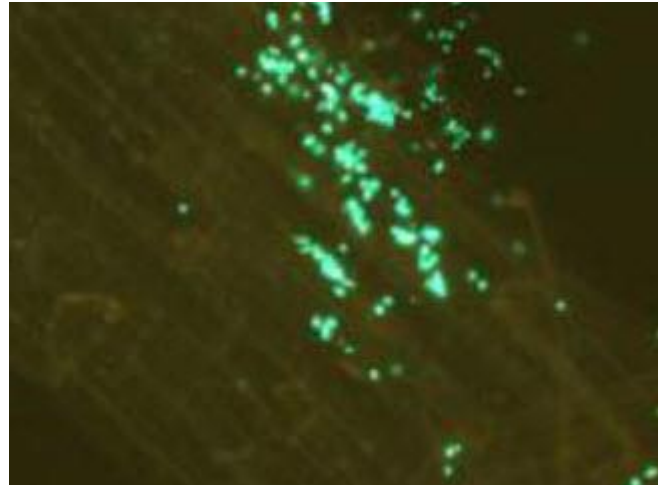


Figura 8. Registro da *E. coli* O157:H7 sobre folha de alface, feita por microscopia confocal de fluorescência (HOU et al., 2013).

Como bactéria integrante das *Enterobacteriaceae*, a *E. coli* é um bacilo gram-negativo que pode crescer em meios com condições aeróbias e anaeróbias, como o Ágar Sangue, Lúria Bertami, ou mais seletivos como o Ágar MacConkey (Figura 9). Possuem fímbrias ou adesinas que permitem a fixação na parede celular, dificultando o arraste. As exigências para o crescimento são simples pois fermentam a glicose, reduzem o nitrato a nitrito e são catalase-positivas. Não possui atividade do citocromo oxidase, o que o difere de muitos outros bacilos gram-negativos. Possui capacidade de fermentar lactose (lactase-positiva), enzima que permite a fermentação de açúcares e é responsável pela flatulência pós ingestão de leite. Pode ser armazenada em meio constituído de leite em pó. Alguns dos fatores de virulência vinculados são a endotoxina e a cápsula. A endotoxina é um fator de virulência compartilhado por quase todas as bactérias gram-negativas e sua atividade está ligada ao componente lipídico A do lipossacarídeo ou lipopolissacarídeo, presente na membrana. É liberado pela ocasião da lise (rompimento da membrana celular). Efeitos comuns são coagulação intravascular disseminada, febre, diminuição da circulação periférica, choque e morte (MURRAY, 2004; TRABULSKI e ALTHERTUM, 2008).

A dimensão dos bastonetes da bactéria *E. coli* varia entre 1 a 1,5  $\mu\text{m}$  de largura e de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento. O peso é especulado em 1 picograma por unidade (CHING, 2013). O principal antígeno é o lipopolissacarídeo (LPS) e pode ser classificada desta forma, pela sorologia ligada ao LPS. Quatro classificações expressam as estruturas da *E. coli* de acordo com os antígenos: O (somático), K (capsular), H (flagelar) e F (fimbrial). Para o somático, há 174 antígenos atualmente, que são determinados por carboidratos na cadeia da molécula de lipopolissacarídeo presente na parede celular (GOMES, 2014).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

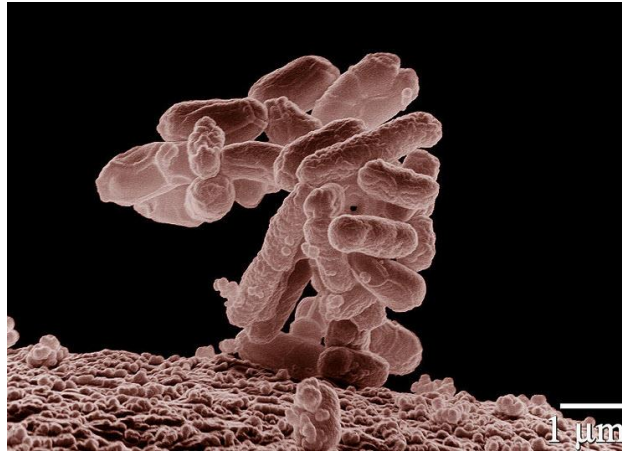


Figura 9. Micrografia eletrônica de aglomerado de bactérias *E. coli* (CONTRIBUTORS, 2011).

O crescimento da *E. coli* é característico, contemplando a fase *lag* (adaptação ao meio de cultura e a temperatura), exponencial, estacionária e de declínio (Figura 10). Dependendo da natureza do meio, o tempo de geração varia entre 20 a 25 minutos, podendo chegar até 50 minutos em caldos sintéticos (glicose + sais). A velocidade do crescimento é dependente da concentração de nutrientes, da temperatura de operação (em torno de 37°C) e da agitação (100 rpm). Os métodos de contagem da *E. coli* podem ser feitos de modo direto, como centrifugação e peso seco ou contagens de forma indireta também, como concentração de nitrogênio, medidas de consumo metabólico, estimativas colorimétricas, contagem em placas, avaliações espectrofotométricas e turbidimétricas (TRABULSKI e ALTHERTUM, 2008).

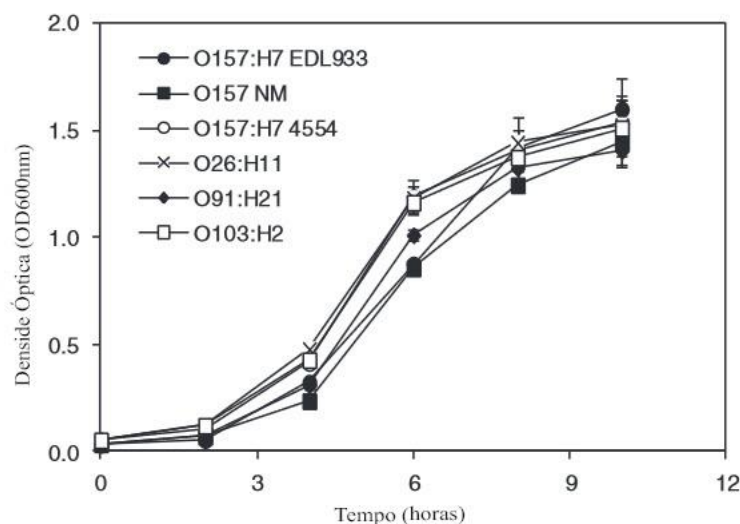


Figura 10. Curvas de crescimento de diferentes cepas de *E. coli* em meio de nutrientes específico (MA et al., 2014).

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

Uma das bactérias patogênicas controlada na indústria de processamento de alimentos é a *E. coli* O157:H7. Como método de detecção rápida é sugerido uma reação de ligação na superfície de um sensor. Reações ligadas a um complexo antígeno – anticorpo catalisam de forma a precipitar sobre a superfície de sensoriamento, aumentando assim, a massa sobre o sensor e modificando a frequência de ressonância (GRIMES *et al.*, 2011).



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.3 MÉTODOS CONVENCIONAIS DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

Atualmente a detecção de bactérias em alimentos e em águas para consumo é feita por métodos clássicos que contemplam as fases de enriquecimento seletivo ou pré-enriquecimento, seguidos por testes que avaliam a morfologia, ensaios imunológicos e bioquímicos. Mesmo que eficientes, de custo médio e já estabelecidos, tais métodos mostram desvantagens como a necessidade de espera de dias pelo resultado final. As bactérias possuem propriedades fenotípicas (características como morfologia, desenvolvimento, propriedades químicas ou fisiológicas e comportamento) que podem não ser sempre expressas o que dificulta a interpretação dos resultados oferecidos por estes métodos. Os métodos convencionais de detecção (Tabela 2) sugeridos são o PCR (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), imunológicos como exemplo o de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) e meios de cultura (FREITAS *et al.*, 2006).

Tabela 2 - Comparativo entre os métodos de detecção e quantificação de bactérias utilizados em ambientes voltados à biossegurança, ambiente hospitalar e setor alimentício (LEE *et al.*, 2014).

Método de Detecção	Limite de Detecção	Tempo de Análise
PCR	Simples Célula	Horas
Elisa	$10^3$ a $10^6$ UFC.ml <sup>-1</sup>	Horas a dias
Meios de Cultura	Simples Célula	Horas

##### 3.3.1 Método PCR

A reação em cadeia da polimerase é um método de amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) sem a necessidade de organismo vivo. As áreas de uso são laboratórios de pesquisas médicas e biológicas para executar a tarefa de sequenciamento de genes e diagnóstico de doenças hereditárias, testes de paternidade e de doenças infecciosas. O método em si se baseia em replicação *in vitro*, após a extração do DNA e adição de *primers* e enzimas, em soluções tampão. Essa mistura é tratada em termociclador que executa o aquecimento em tempos específicos de cada reação, propiciando assim, a replicação do

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

fragmento. O resultado é apresentado através da eletroforese em gel. As vantagens são de alto nível de exatidão com o comparativo usado. A grande desvantagem é o tempo que o método necessita até o resultado final. O limite de detecção e quantificação deste método é de  $10^3$  UFC.ml<sup>-1</sup> a simples célula (ATEBA e MBEWE, 2013; LUEDTKE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014).

#### 3.3.2 Método ELISA

O método ELISA, executa um teste enzimático que revela anticorpos específicos e é usado para diagnóstico de várias doenças que induzem a formação de anticorpos. O teste de ELISA (Figura 11) tem por base uma reação antígeno-anticorpo e é realizada em microplacas de 96 poços onde é depositada a amostra alvo de interesse (antígeno) juntamente com tampão para sensibilização. O método requer lavagens com tampão PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e posteriormente são feitos bloqueios com BSA (*Bovine Serum Albumin*) para ligações não específicas e geração de falsos positivos ou negativos. Após lavagens com PBS, é adicionado o anticorpo primário e em seguida o anticorpo secundário que está acoplado em uma enzima (peroxidase) que irá produzir uma substância corada. Posterior a lavagens para a remoção de anticorpos secundários, adiciona-se ao substrato um cromógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para a enzima produzir a substância corada. A partir desse procedimento, pode-se medir a intensidade de cor da superfície, quantificar e verificar se há alguma substância de interesse. Vantagens como alta sensibilidade e especificidade são agregadas ao teste de ELISA. Desvantagens como necessidade de mão de obra especializada, degradação de reagentes, alto valor agregado (kit ELISA) do método e alto tempo para execução são verificados. O limite de detecção está na ordem de nano gramas (TATINENI *et al.*, 2013).

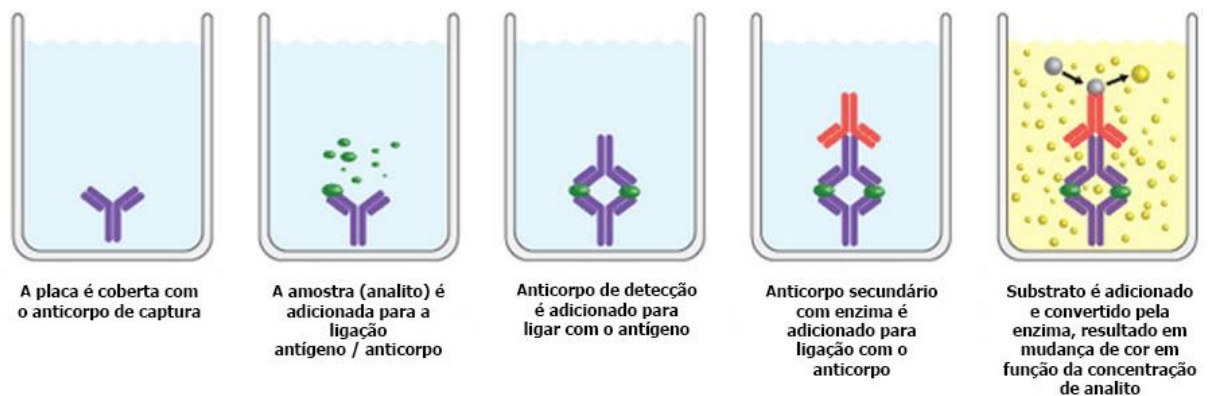


Figura 11. Método de ELISA para detectar quantidades de proteínas na ordem de nano gramas (PADRÃO, 2010).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.3.3 Método de Cultura

Os meios de cultura para crescimento e contagem de bactérias podem ser meios líquidos (LIQ) e meios semi-sólidos (SS). Ambos tipos de meios de cultura são preparados com água destilada, sofrem aquecimento para dissolução total dos solutos e posteriormente são esterilizados por autoclavagem a 121°C. Os meios LIQ permitem uma melhor difusão dos metabólitos, mas não o isolamento das colônias. Os meios sólidos permitem o crescimento até a exaustão dos nutrientes o que permite a individualização das colônias, podendo distinguir se há tipos de bactérias diferentes e também quantas foram criadas. Vários tipos de meios de cultura podem ser usados para o crescimento e quantificação de bactérias, como os meios seletivos, diferenciais e indicadores. Pela conveniência, as culturas em meio SS são as indicadas para o isolamento de colônias. Diferentes bactérias formam colônias com tamanhos, cores, texturas e aromas diferentes. A cultura em meio SS é feita nos modos “*streak plate*” (esgotamento) ou por “*spread plate*” (propagação). O primeiro modo nos permite a diferenciação das colônias e o segundo propicia a contagem dos organismos (Figura 12 e 13) (Appendix 9 - Sterilization Methods, 1996; BECKER *et al.*, 1996).

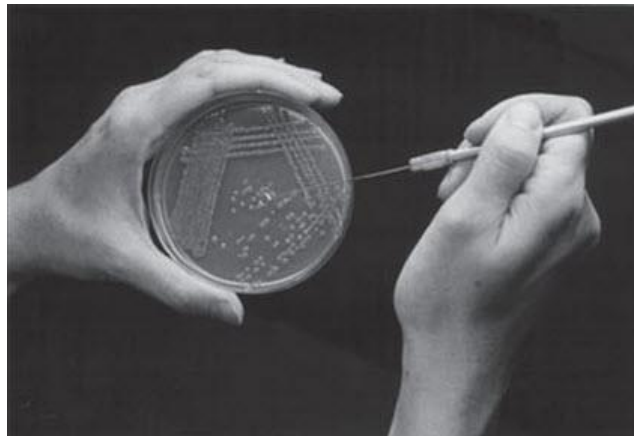


Figura 12. *Streak plate* de colônia específica na superfície de uma placa de cultura para a verificação de tamanho, cor e textura (BIOCYCLOPEDIA, 2012).



Figura 13. *Spread plates* de contagem de bactérias em 5 diluições a partir de cultivo em meio líquido, após crescimento de 40 horas a 25°C (WISE, 2006).

### 3.4 CORTE DIMENSIONAL E DEPOSIÇÃO DE Cr/Au

Independentemente do tamanho dos sensores magnetoelásticos, dois processos de fabricação são necessários para a construção de uma peça transdutora apropriada, de dimensão ideal para cada uso e com superfície funcionalizável (superfície que possua radicais de acoplamento com anticorpos ou bactérias): o corte dimensional e a deposição de cromo e ouro.

#### 3.4.1 Corte dimensional

Para reduzir os tamanhos dos sensores magnetoelásticos a nível milimétrico, com precisão e em grande quantidade, o corte da dimensão apropriada é promovido por uma serra automática conhecida como serra de micro corte, mesmo equipamento de corte utilizado para células solares de captação de energia (Figura 14).

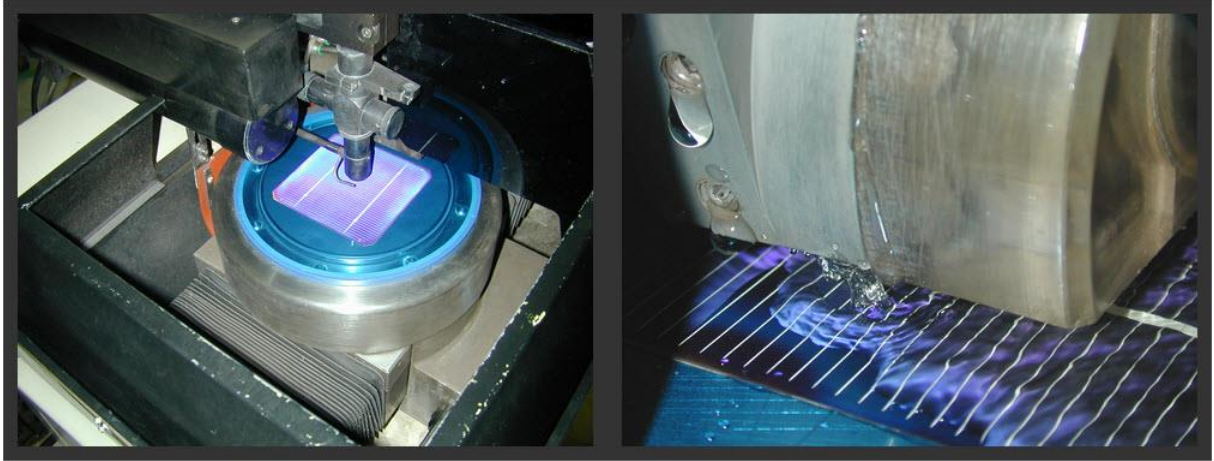


Figura 14. Sistema de corte *Microdicing-saw* para corte de peças com dimensões precisas (KULICKE, 2014).

### 3.4.2 Deposição de Cromo e Ouro

Para a proteção contra a oxidação e a promoção da superfície funcionalizável do sensor magnetoelástico, há necessidade de recobrimento com uma camada de espessura nanométrica de Ouro (Au) intermediada por uma camada nanométrica de Cromo (Cr), que atua como adesivo entre o sensor magnetoelástico e o Au. A deposição é executada através do método de *sputtering*, em condições de vácuo para minimizar moléculas residuais de oxigênio. A espessura da camada é relativa ao tempo de deposição, e, geralmente, as dimensões para biosensores magnetoelásticos da camada de Cr são em torno de 130 nm e 115 nm, respectivamente. A proposta final da deposição de Au é tornar a superfície do sensor magnetoelástico bioativa e iniciar a construção de um biosensor magnetoelástico (HUANG *et al.*, 2008).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.5 BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO E SISTEMA DE LEITURA

##### 3.5.1 O biosensor magnetoelástico

Por definição, o biosensor (transdutor) é um pequeno dispositivo que converte uma resposta bacteriológica causada por um organismo (células, bactérias ou qualquer ligante específico) e a transforma em sinal elétrico (Figura 15). Os dois componentes principais deste biosensor são o elemento de reconhecimento biomolecular do organismo através de ligações específicas, e o transdutor de sinal (biosensor magnetoelástico) que converte o evento de reconhecimento em um sinal elétrico mensurável. Quando o evento de reconhecimento biomolecular ocorre, o sinal elétrico é rapidamente captado pelo biosensor magnetoelástico e repassado para o sistema de leitura. As vantagens do uso de um biosensor são a rapidez de leitura, a sensibilidade e ligações com alvos específicos e aplicação em biossegurança, hospitais e indústrias da área alimentícia (HORIKAWA, 2013).

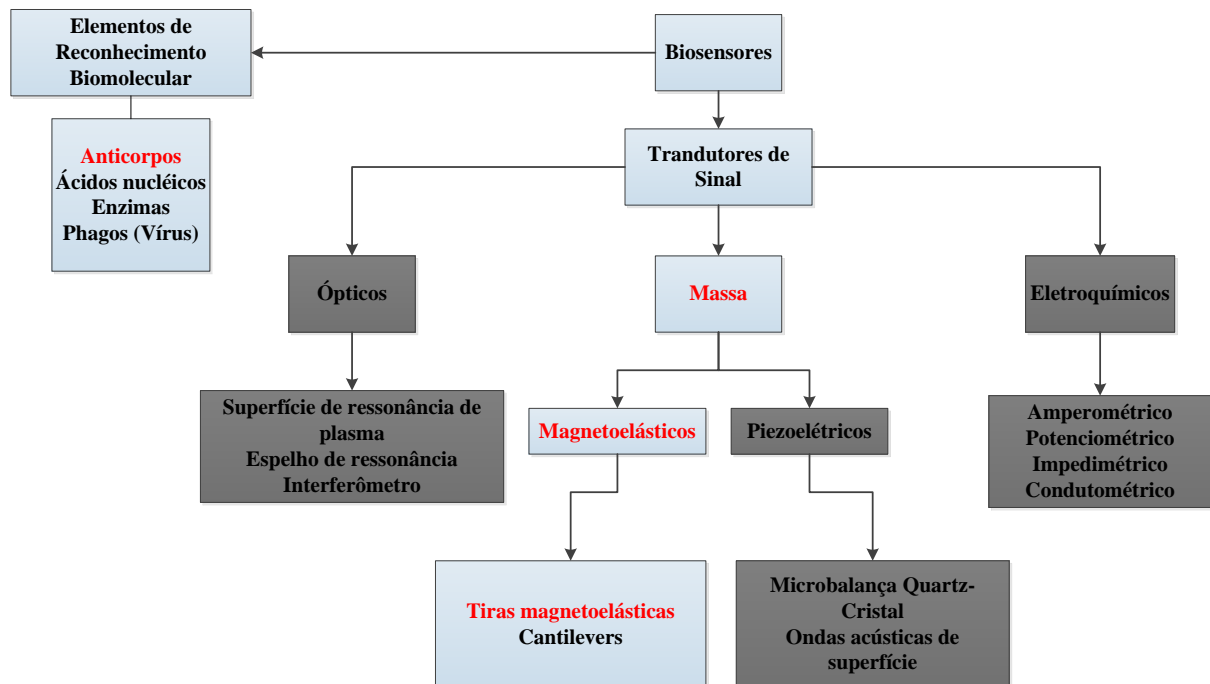


Figura 15. Tipos de biosensores e elementos de reconhecimento biomolecular comumente usados para detecção de patógenos nas áreas de biossegurança, hospitalar e alimentícia (HORIKAWA, 2013).

Quando o patógeno alvo é imobilizado na superfície do sensor, ocorre o aumento de massa que provoca a diminuição da frequência de ressonância, conforme a Equação 2. Essa diminuição de frequência corresponde ao aumento de massa ( $\Delta m$ ) uniformemente ligada na superfície do biosensor. Biosensores de diferentes tamanhos possuem um limite mínimo de



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

bactérias detectáveis, que está relacionado com a mudança de massa mínima detectável ( $\Delta m_{min}$ ), a sensibilidade de massa e a mudança de frequência mínima ( $\Delta f_{min}$ ), que é relacionada ao limite de detecção do sistema de leitura das frequências (Equação 7).

$$\Delta m_{min} = \frac{\Delta f_{min}}{S_m} \quad (7)$$

A partir do  $\Delta m_{min}$  é possível verificar o número mínimo detectável de bactérias ( $N_{min}$ ) na superfície de cada biosensor, de acordo com a massa do patógeno em questão.

$$N_{min} = \frac{\Delta m_{min}}{(massa\ do\ patógeno)} \quad (8)$$

Especulando valores de 1 Hz para  $\Delta f_{min}$  e a massa de 1 pg para bactéria *E. coli*, as tabelas 4 e 5 mostram a  $\Delta m_{min}$  detectável e o número mínimo ( $N_{min}$ ) de bactérias correspondente (SIU, 2003). A Tabela 3 mostra os valores teóricos para o número mínimo de bactérias.

Tabela 3 - Massa mínima detectável e número mínimo de bactérias detectáveis. Dados gerados através das Equações 7 e 8, variando p comprimento (L) e largura (W) e mantendo a espessura do sensor em 30  $\mu$ m, juntamente com  $f_0$  e  $S_m$  de cada dimensão específica.

Dimensão			Frequência Fundamental	Sensibilidade de Massa		
L (m)	W (m)	t (m)	$f_0$ (Hz)	$S_m$ (Hz.pg <sup>-1</sup> )	$\Delta m_{min}$ (pg)	$N_{min}$ (batérias)
0,001	0,0002	0,000030	2226967	2,35E-02	43	<1
0,002	0,0004	0,000030	1113483	2,94E-03	341	<1
0,003	0,0006	0,000030	742322	8,70E-04	1149	1
0,004	0,0008	0,000030	556742	3,67E-04	2724	3
0,005	0,0010	0,000030	445393	1,88E-04	5321	5
0,006	0,0012	0,000030	371161	1,09E-04	9195	9
0,007	0,0014	0,000030	318138	6,85E-05	14601	15
0,008	0,0016	0,000030	278371	4,59E-05	21795	22
0,009	0,0018	0,000030	247441	3,22E-05	31033	31
0,010	0,0020	0,000030	222697	2,35E-05	42569	43

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para especular a variação máxima de frequência de ressonância ( $\Delta f_{\max}$ ) a partir de uma concentração de bactérias, é possível resolver as equações (7) e (8) para a análise:

$$\Delta f_{\max} = S_m \cdot N_{\max} \cdot m \quad (9)$$

Onde  $\Delta f_{\max}$  representa a variação máxima de frequência de ressonância causada pela concentração usada na diluição contaminante ( $N_{\max}$ ). A massa do patógeno corresponde a  $m$ .

#### 3.5.2 Sistema de leitura de biosensores magnetoelásticos

Para a determinação da frequência de ressonância dos biosensores é necessário construir um pequeno solenoide (*pick-up coil*), onde o biosensor deve ser posicionado na parte central. O *pick-up coil* é conectado a um analisador de redes (Figura 16) que emitirá um sinal AC incidente para excitar magneticamente a vibração longitudinal do biosensor. O sinal resultante é comparado com o sinal incidente em um intervalo de frequências conhecidas a partir de resultados teóricos relacionados a dimensão e propriedades do biosensor magnetoelástico. Para ampliar a magnitude do pico de ressonância do biosensor magnetoelástico, um campo DC (DC bias) é aplicado no *pick-up coil* em voltagem apropriada.

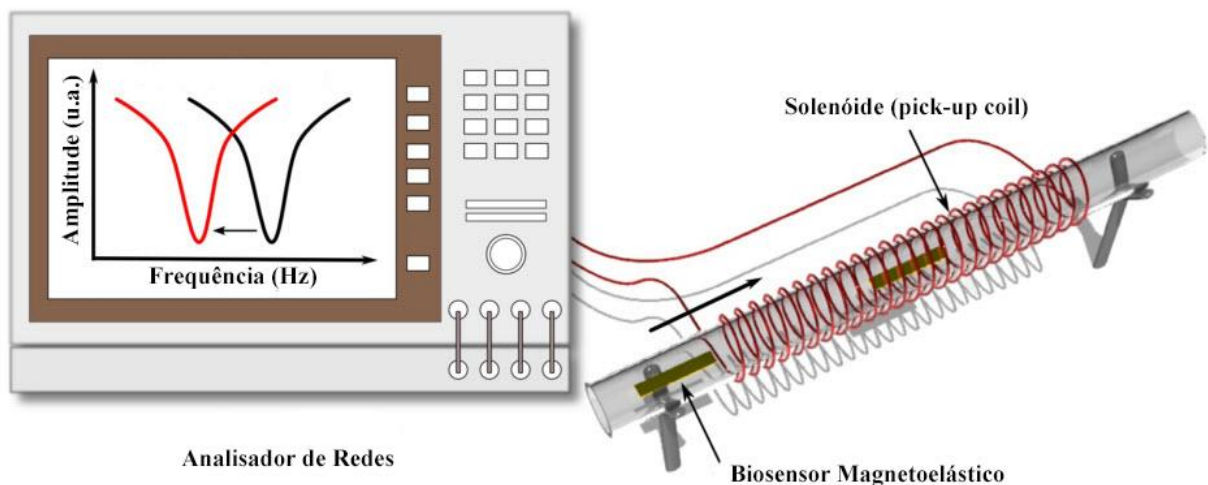


Figura 16. Sistema de leitura de frequências de ressonância de biosensores magnetoelásticos composto por Analisador de Redes e *pick-up coil* (HORIKAWA, 2013).



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.6 CAMADAS AUTO-ORGANIZÁVEIS DE CISTAMINA E OS ANTICORPOS NA FORMAÇÃO DE BIOCONJUGADOS

Possuindo um transdutor de dimensão adequada, coberto com Au e com a superfície funcionalizável, é possível iniciar a formação de camadas organizadas para a alocação do sistema de atração de patógenos. Vários tipos de camadas organizáveis são sugeridos, entre elas a de cistamina (CYS). Para a ligação do patógeno é sugerido o uso de anticorpos (Ac) ligados a CYS, formando a relação conhecida como bioconjugados (FERREIRA *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2010).

##### 3.6.1 A formação de camadas auto-organizáveis de tiolatos

O uso das monocamadas auto organizadas (SAM) tem sido estudada com intensidade nos últimos anos e o uso é mostrado de forma extensiva na produção de biosensores para detecção de patógenos. A formação da SAM apresenta alta organização e é promovida pela imersão de um substrato sólido em uma solução constituída de moléculas que se comportam como ácido ou base (anfóteras). Existe uma grande variedade de substratos para a produção de SAM como prata, paládio, ouro, entre outros. A força motriz que une o adsorbato e o substrato se origina a partir de interações hidrofóbicas, do tipo Van der Waals (FREIRE *et al.*, 2003; LOVE *et al.*, 2005).

Diversos tipos de moléculas podem ser empregados para a formação das SAM, adsorvidas na superfície metálica designada. Em geral, os chamados alcanotióis são usados para a adsorção na superfície de Au, pela estabilidade química e a fácil formação de SAM, por meio da ligação covalente entre Au-SH (Figura 17). Os diferentes alcanotióis possuem propriedades e funções diferentes para cada situação de detecção. Em geral os alcanotióis mais usados são os *n*-alcanotióis, alcanoditióis, carboxialcanotióis, tióis aromáticos e aminoalcanotióis (HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH<sub>2</sub>), em especial para o uso com anticorpos (WILLIAMS e GUPTA, 2003; ARYA *et al.*, 2006; CODOGNOTO *et al.*, 2007; MOCCELINI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

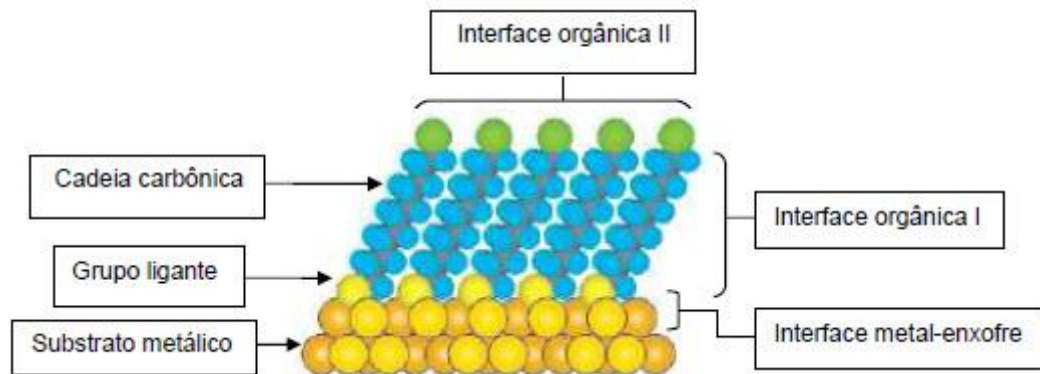


Figura 17. Estrutura das monocamadas auto organizáveis em superfície de biosensores (LOVE et al., 2005).

A interface metal-enxofre corresponde a região de adsorção, onde a molécula de Enxofre (S) apresenta o sítio de adsorção com a superfície do Au (substrato metálico). A interface orgânica I corresponde a cadeia orgânica intermediária que ligará a interface metal-enxofre com uma segunda cadeia orgânica (cadeia carbônica). A interface orgânica II corresponde ao grupo funcional terminal capaz de interagir com espécies que estão em meios contaminantes.

A quimissorção (adsorção química) de tiolatos na superfície de Au, ocorre espontaneamente e as razões que promovem esse fenômeno são as seguintes: a relativa inércia do Au, forte interação específica e estável com o S e a formação de camadas de bom empacotamento. Além disso, podem se ligar a diversos outros grupos funcionais (MOCCELINI *et al.*, 2009). A adsorção química dos tiolatos pode ser afetada pelo uso de solventes com afinidade pela superfície de Au, ou quando o adsorbato possui grande afinidade pelo solvente. Solventes como o tolueno, metanol, hexano e álcool etílico são comumente usados para a adsorção de alcanotióis na superfície de Au. Em caso especial, o etanol que é comumente utilizado por apresentar baixo custo, pureza e toxicidade irrelevante (CARVALHAL, 2005; MENDES *et al.*, 2008).

A temperatura de aplicação influencia na preparação das SAM usando tiolatos. A temperatura de formação indicada fica em torno de 25°C, o que reduz o número de defeitos entre as moléculas na compactação (RANIERI *et al.*, 2009).

A concentração e o tempo de aplicação são fatores que também contribuem na formação das SAM. Sendo estes inversamente proporcionais, altas concentrações de tiolatos requerem menos tempo sobre a superfície de Au, ou seja, soluções com baixa concentração requerem maiores tempos para a formação das SAM. Soluções extremamente diluídas não são indicadas pois as impurezas de compostos que eventualmente estejam no meio, podem

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

atrapalhar a formação, ou até mesmo a oxidação dos grupos tióis (EL-DEAB e OHSAKA, 2004; CAMPUZANO *et al.*, 2006).

As etapas de formação de monocamadas (Figura 18) podem ser descritas em duas fases: a inicial, que apresenta uma quimissorção caótica, seguida de organização em dependência temporal. Em modos gerais, há crescimento rápido da camada (80-90%) que corresponde a quimissorção caótica e posteriormente uma organização de adsorção mais lenta, compreendida em horas. Essa organização lenta é caracterizada pelo alto grau de compactação e redução de possíveis defeitos na monocamada (ULMAN, 1996).

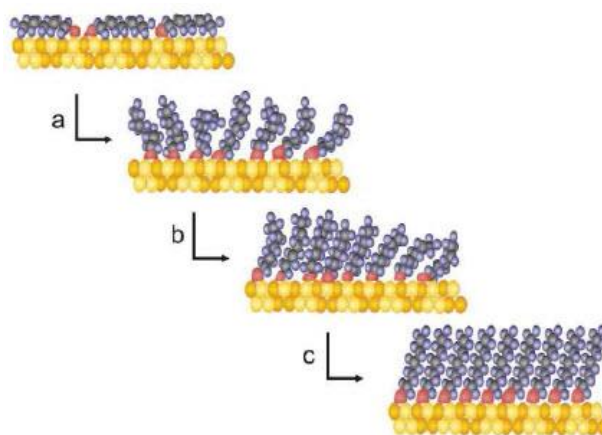


Figura 18. Formação da SAM mostrando as etapas de formação compostas por rápida adsorção (a), seguida de processo de crescimento lento (b) e pôr fim a formação de auto camada organizada (c) (CANCINO, 2008).

O processo de adsorção de tióis sobre a superfície de Au é compreendida em três etapas: a quebra da ligação S-H, a formação da ligação de Au-S e a liberação do cátion  $H^+$  para o meio. De acordo com Schlenoff *et al.* (1995), a junção entre o Au e S é muito forte e a intensidade energética está em torno de  $40 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . O processo físico-químico de adsorção de tióis é representado pela reação a seguir:



#### 3.6.2 A cistamina para formação de SAM

Vários tipos de compostos orgânicos são usados para a formação de SAM contendo terminações de cadeia compostas de ácido carboxílico e aminas ( $R-COOH$ ,  $R-NH_2$ ), entre eles, o ácido mercaptopropiônico, ácido tioláico, ácido mercaptoundecanóico e a CYS (LEE *et al.*, 2009).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A molécula da CYS ( $C_4H_{12}N_2S_2$ ) é um dissulfeto que possui dois átomos de S na cadeia e dois nitrogênios nas extremidades, que podem ser facilmente caracterizados por FTIR (Infravermelho por transformada de Fourier) (Figura 19). Para que haja a formação da SAM é necessário que a CYS sofra uma quebra entre os átomos de S (Figura 20). Em caso especial para a CYS, a quebra da molécula libera duas unidades de S (Enxofre) para a ligação com o Au, o que pode favorecer (aumentar a probabilidade) um acoplamento mais próximo de cada molécula, em relação a outros tipos de SAM (WIRDE *et al.*, 1999; PILLAY *et al.*, 2009).

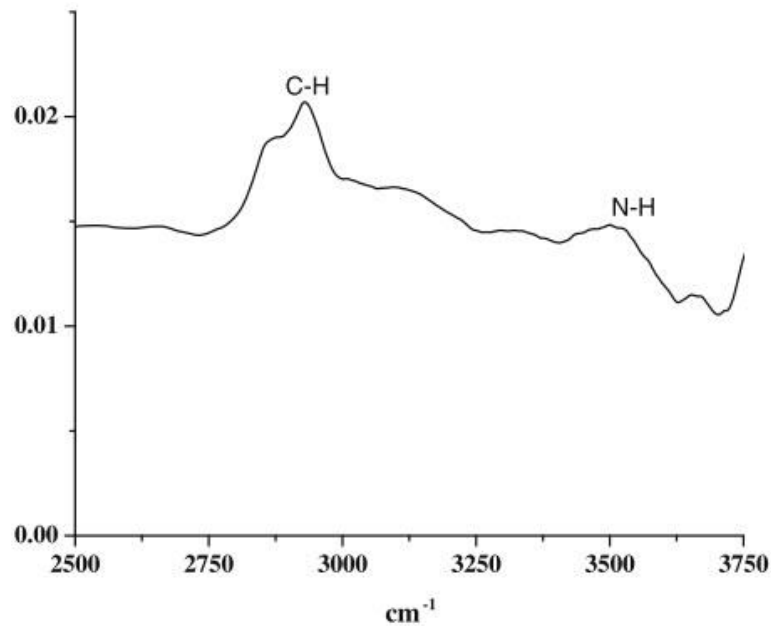


Figura 19. FTIR da cistamina mostrando o desdobramento molecular N-H em torno de 3500 cm<sup>-1</sup>, em específico para eletrodos cobertos com Au em análise eletroquímica (FERREIRA *et al.*, 2009).

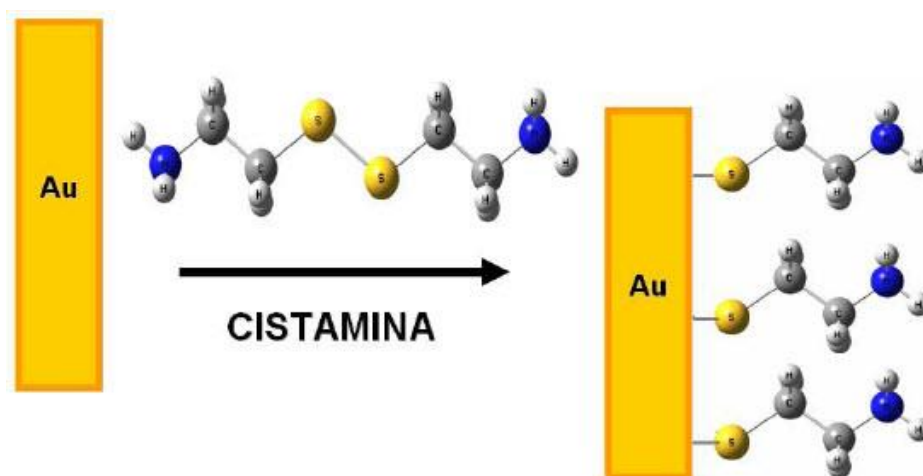


Figura 20. Formação da SAM sobre superfície de Au com uso de CYS dissolvida em Etanol (MOSSANHA, 2011).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.6.3 Formação de bioconjugados

##### 3.6.3.1 A estrutura do anticorpo

Os anticorpos (Ac) são proteínas específicas criadas para a defesa imunológica dos organismos (Figura 21). O Ac é moldado pela mesma estrutura do antígeno (indivíduo contaminante), que é responsável pela sua criação e formar uma ligação específica entre ambos. A formação dos Ac se dá pelos linfócitos-B quando detectada a presença do antígeno na corrente sanguínea. Quando o corpo é contaminado por um antígeno, uma reação específica acontece entre o linfócito-B e o antígeno, formando os Ac. Em sequência, a reação leva à criação de células de memória que garantem que o corpo reaja contra o antígeno em contaminações futuras, se tornando resistente. Na produção dos Ac comerciais, um animal (por exemplo camundongos, macacos e coelhos) é inoculado com um antígeno. Os linfócitos-B são removidos do baço do animal e incubados “*in vitro*” (HOPKINS, 2009).

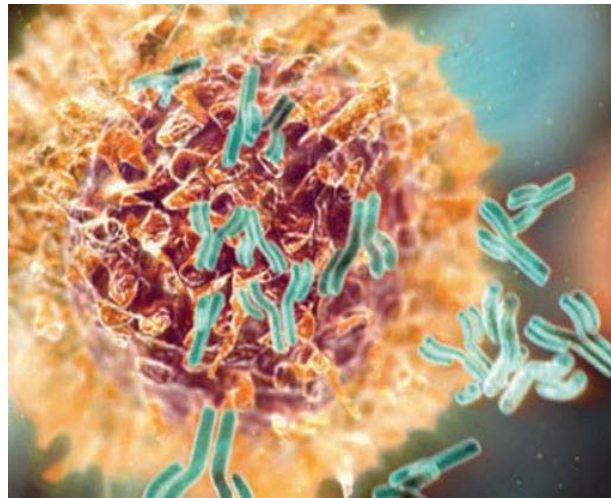


Figura 21. Anticorpo (azul claro) acoplado em antígeno celular (FERREIRA, 2013).

Os Ac de forma genérica, possuem duas estruturas principais de ligação, a região Fab e a Fc (Figura 22). A região Fab é responsável pela ligação com o antígeno e a região Fc é apta a ligar-se a vários tipos de estrutura, inclusive a compostos amina pois possui região terminada em carboxilato (STANFIELD, 2014).

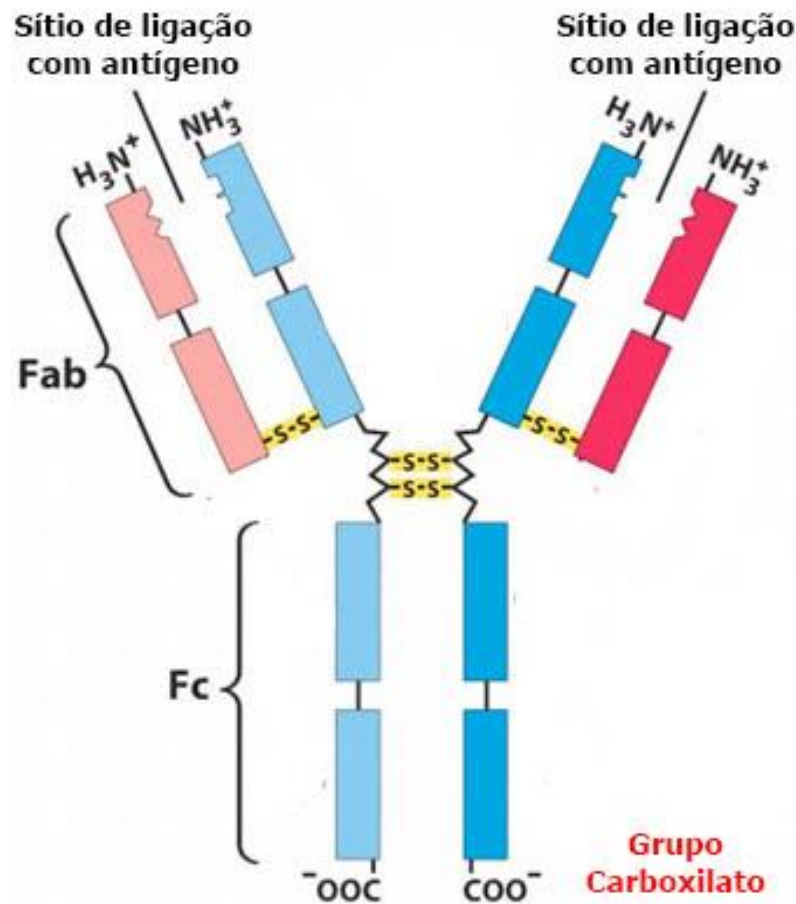


Figura 22. Regiões do anticorpo que mostram a ligação com o antígeno e com cistamina, conhecidas como regiões Fab e Fc (MANDAL, 2012).

### 3.6.3.2 A junção entre a Cistamina e o anticorpo intermediada pela reação Carbodiimida

Nas proteínas (anticorpos), o grupo carboxilato ( $COO^-$ ) pode ser derivado através da utilização de agentes de formação de ligação amida ou através de um éster ativo ou intermediários de grupo carbonila reativos (Figura 23). O carboxilato se torna um agente de acilação com o grupo modificador. Aminas contendo nucleófilos podem ligar com carboxilatos ativados e formar amida como derivados. Grupos sulfídricos ( $S-H$ ,  $S-S$ ) quando reativos resultam em uma ligação tio-éster relativamente instável que pode trocar com outros nucleófilos tais como aminas ou hidrolisar em soluções aquosas (HERMANSON, 2008a).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

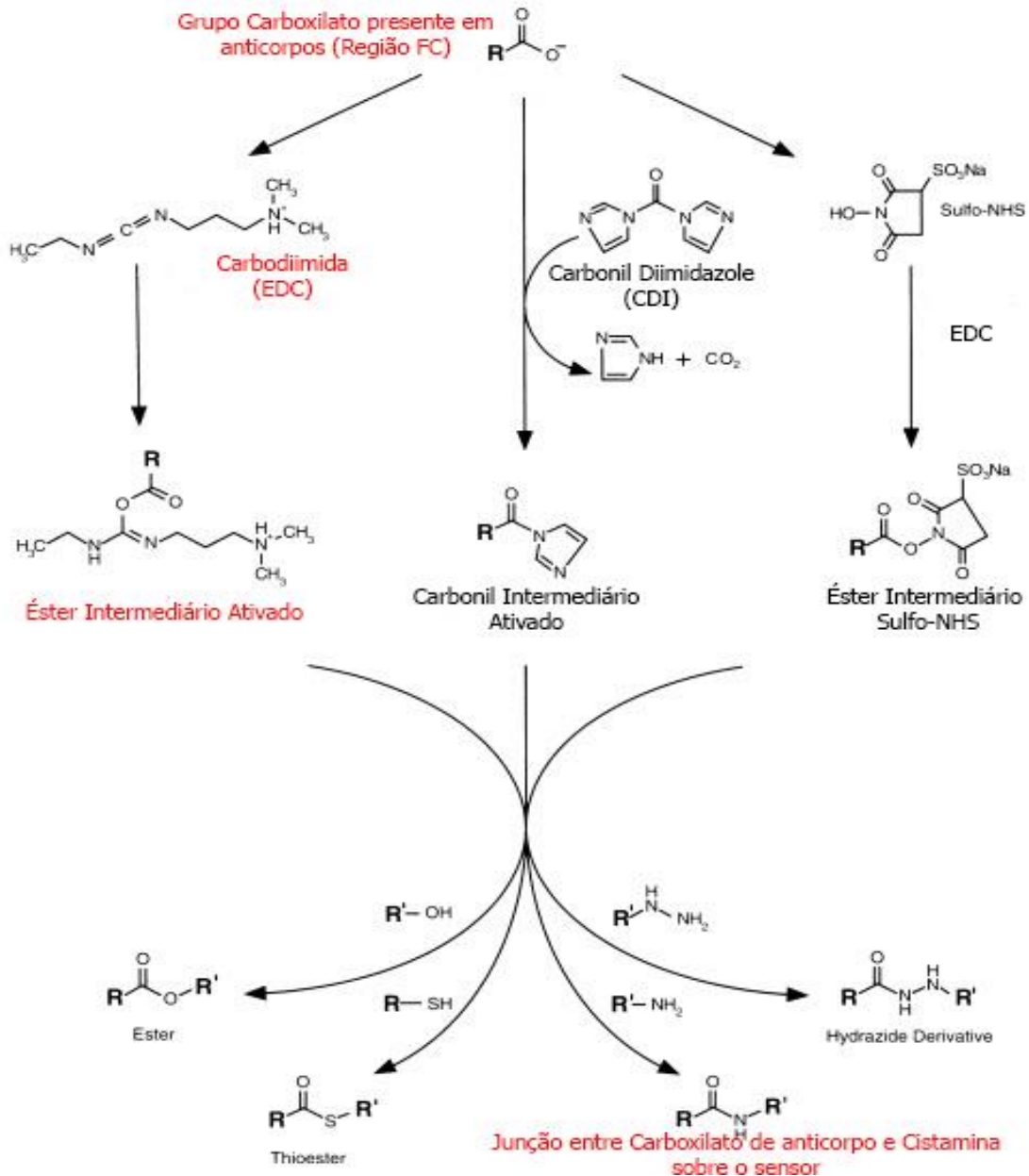


Figura 23. Derivações de ácidos carboxílicos que podem ser preparados através do uso de intermediários ativos que reagem com um grupo alvo funcional para formação de produtos acilatos (HERMANSON, 2008a).

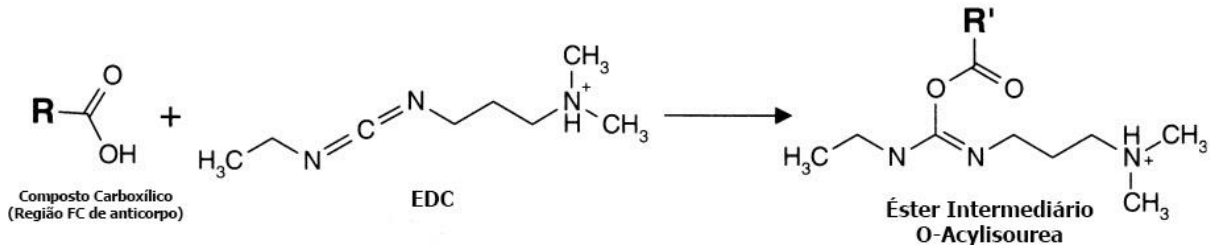
A CYS sendo uma cistina descarboxilada que contém um pequeno grupo dissulfeto com aminas primárias em ambos os lados, torna-se um reagente versátil e pode ser usado em várias técnicas de conjugação. A CYS pode ser usada para introduzir grupos sulfidrílo em proteínas ou em outras moléculas conjugando um de seus grupos amino laterais com os carboxilatos de uma molécula alvo, usando uma reação Carbodiimida como agente de reticulação (*crosslinking*) (HERMANSON, 2008b; c).

A Carbodiimida participa como junção entre a cistamina e o carboxilato e é frequentemente usada em meio aquoso. É fornecida com o nome de EDC, cloro hidratado (N-

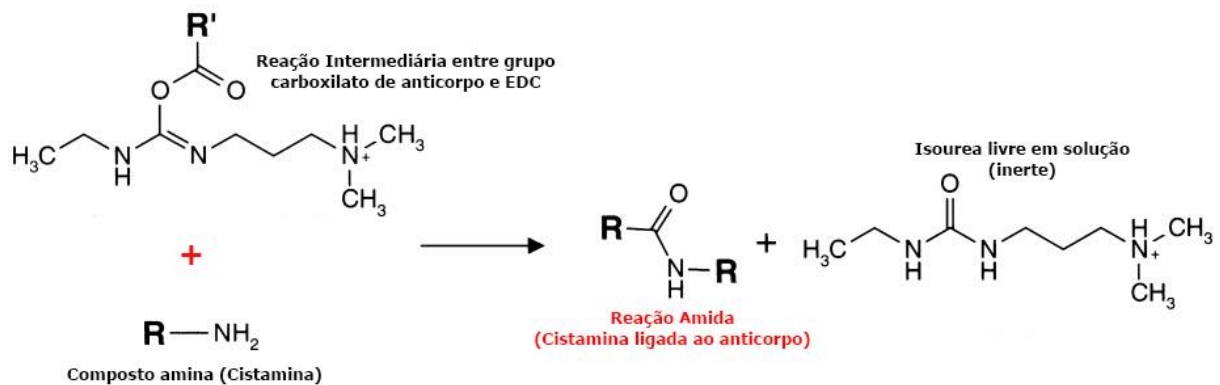


### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride). Também chamada como agente de reticulação *zero-length*, a Carbodiimida não forma estruturas químicas adicionais entre as moléculas de conjugação. Carbodiimidas podem reagir com ácidos carboxílicos para a formação de éster o-acylisourea que apresenta curto tempo de formação, de acordo com a reação a seguir:



Em seguida, a espécie o-acylisourea gerada na reação entre o ácido carboxílico e o EDC podem reagir com um nucleófilo, como uma amina primária para a formação de uma ligação amida, mostrado na reação a seguir:



O EDC reage rapidamente com carboxilatos para a formação de um éster intermediário ativado, que reage com aminas primárias (Figura 24). A reação se torna eficiente entre o intervalo de pH 4,7 a pH 7,5, o que sugere uma grande variabilidade de uso de soluções tampão, desde que não contenham grupos que entrem em competição na reação (ROSKAMS e RODGERS, 2002; HERMANSON, 2008c).



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

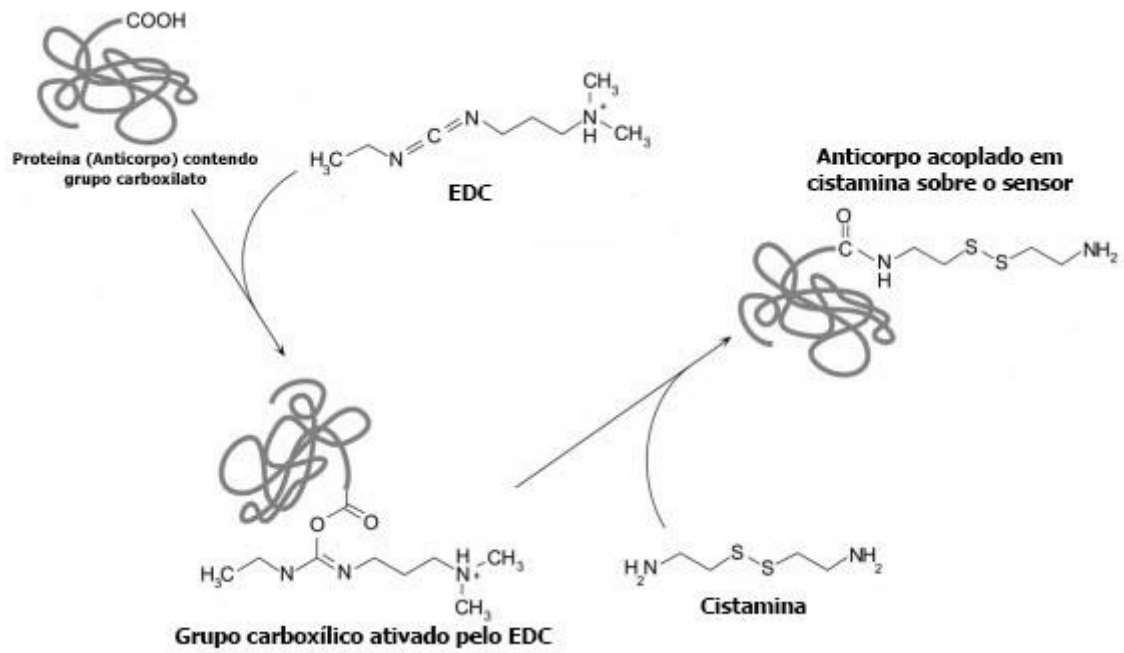


Figura 24. Reação de conjugação de grupo carboxilato, EDC e cistamina com o anticorpo formando uma proteína marcada com cistamina na superfície de sensor magnetoelástico (HERMANSON, 2008c).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.7 SISTEMA DE ANÁLISE DE BACTÉRIAS POR BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO E CONTAMINAÇÃO

Após executado o corte dimensional, a deposição de Cr/Au, a formação da SAM de CYS e a formação de bioconjugado com o anticorpo específico relacionado a bactéria alvo (analito), o biosensor está pronto para o uso (Figura 25). O analito pode ser introduzido em diluições seriadas sobre a superfície do sensor de modo a captar as diferentes características de curva de saturação e variações na frequência de ressonância.

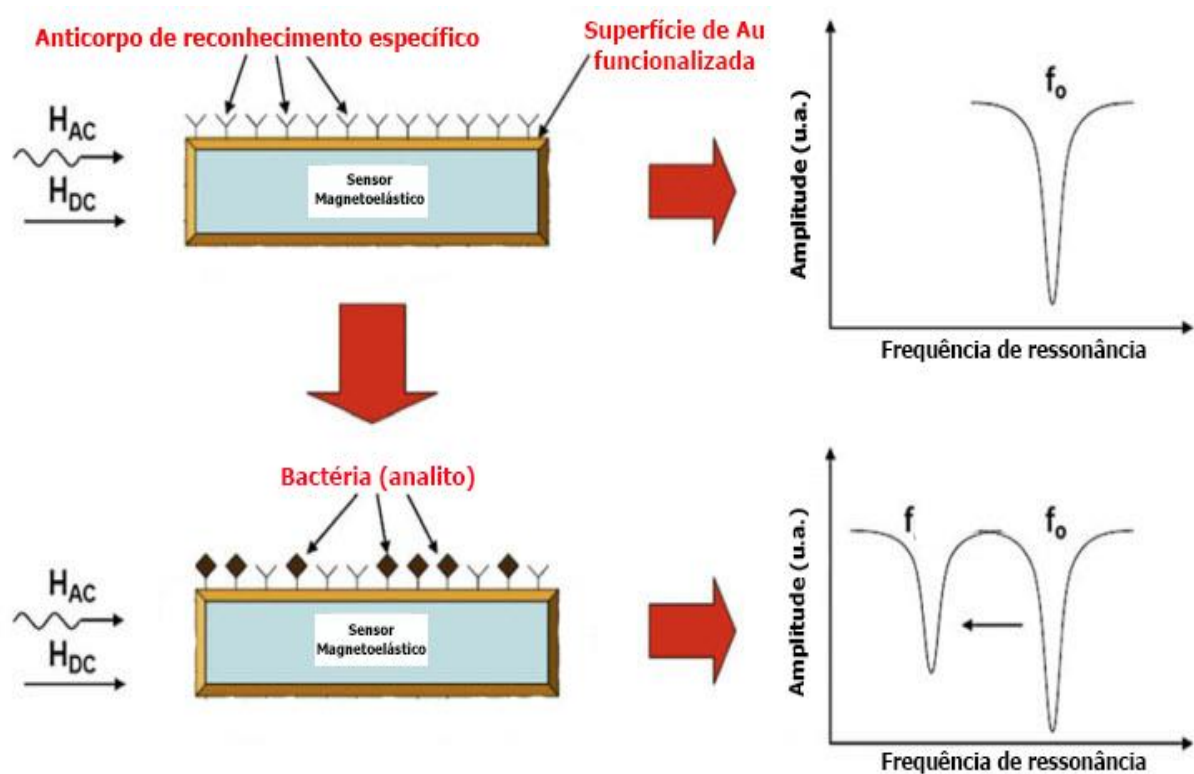


Figura 25. Biosensor magnetoelástico em fase de contaminação para análise de detecção e quantificação de bactérias (XIE et al., 2009).

Supondo a dimensão média de uma bactéria *E. coli* com 2,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1  $\mu\text{m}$  de largura e uma compactação perfeita sobre a superfície funcionalizada do biosensor magnetoelástico, é esperada a imobilização de  $2,0 \times 10^6$  bactérias para um sensor de dimensão de 5 mm de comprimento e 1 mm de largura. O abalo que essa quantidade de bactérias pode causar na frequência de ressonância é de no máximo 376 Hz, como mostrado na Tabela 4.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 4 - Variação máxima de  $\Delta f$  para a compactação máxima de bactérias *E. coli* sobre a superfície do biosensor magnetoelástico. Valores gerados pela Equação 9.

Dimensão			Frequência Fundamental	Sensitividade de Massa			
L (m)	W (m)	t (m)	fo (Hz)	Sm (Hz.pg <sup>-1</sup> )	Compactação Máxima (bactérias por dimensão)	Massa Máxima (pg)	$\Delta f_{max}$ (Hz)
0,001	0,0002	0,000030	2226967	0,02349	80000	80000	1879
0,002	0,0004	0,000030	1113483	0,00294	320000	320000	940
0,003	0,0006	0,000030	742322	0,00087	720000	720000	626
0,004	0,0008	0,000030	556742	0,00037	1280000	1280000	470
0,005	0,0010	0,000030	445393	0,00019	2000000	2000000	376
0,006	0,0012	0,000030	371161	0,00011	2880000	2880000	313
0,007	0,0014	0,000030	318138	0,00007	3920000	3920000	268
0,008	0,0016	0,000030	278371	0,00005	5120000	5120000	235
0,009	0,0018	0,000030	247441	0,00003	6480000	6480000	209
0,010	0,0020	0,000030	222697	0,00002	8000000	8000000	188

Esperamos que qualquer espécie ou partícula que se deposite ou seja depositada sobre a superfície do sensor magnetoelástico cause uma mudança de massa e a respectiva mudança da frequência de ressonância. Entretanto, a formação de precipitado ou acumulação de partículas sobre o sensor magnetoelástico não significa necessariamente que haverá amortecimento nas vibrações da frequência de ressonância. O precipitado ou o organismo deve ligar fortemente com a superfície para que tenha uma mudança na vibração mecânica, e consequentemente, induzir a mudança na frequência de ressonância (RUAN *et al.*, 2004).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O método de montagem do biosensor constitui uma das partes mais importantes do trabalho. Iniciando pela escolha da liga amorfa, o transdutor é processado por micro serra em dimensão adequada e posterior aplicação de camadas Cr e Au para tornar a superfície funcionalizável à ligação com a cistamina. A aplicação da cistamina para a formação das SAM com uniformidade é essencial para a ligação com o anticorpo bem como os tempos diferentes de aplicação. A interação entre a cistamina e anticorpo necessita de intermediação para uma ligação efetiva e posterior captação da bactéria alvo. As análises de frequência de ressonância providas pelo analisador de redes tornam-se fundamentais para a verificação do comportamento do biosensor. Nesta parte avaliaremos o método de montagem do biosensor.

### **4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

#### **4.1.1 Reagentes e vidrarias**

Os reagentes e vidrarias usados nos experimentos foram fornecidos pelo laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA (LGPRD) situado no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS) e as informações estão descritas no Anexo I, Quadro 1. A água destilada foi fornecida pelos laboratórios de Microbiologia da UCS.

#### **4.1.2 Equipamentos**

Os equipamentos usados na produção deste trabalho foram fornecidos pelo LPGRD e o Laboratório de Caracterização Magnética (LCM) da UCS e estão descritos no Anexo I, Quadro 2.

#### **4.1.3 Meio de cultura**

O meio de cultura Luria Bertami (LB) foi selecionado para o crescimento das bactérias utilizadas nos ensaios. As diluições e processo de esterilização seguem em acordo com Sezonov *et al.* (2007).

- Meio semi-sólido – Triptona 1,5%, Peptona 0,5%, NaCl 0,05%, Ágar 1,5% e água destilada;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

- Meio líquido – Triptona 1,5%, Peptona 0,5%, NaCl 0,05% e água destilada.

### 4.1.4 Cepas de bactérias

A cepa de *Escherichia coli* O6 biotype 1 (Migula) Castellani and Chalmers ATCC25922 foi adquirida para os ensaios de contaminação de biosensores, usada para controle de qualidade em testes laboratoriais. A cepa foi mantida congelada a temperatura de -20°C em solução de leite em pó 20%, em *freezer* adequado no LGPRD.

### 4.1.5 Anticorpos primário e secundário

Os anticorpos primário Anti-*E. coli* ab137967 (4,5 mg.ml<sup>-1</sup>) e secundário Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 (2 mg.mL<sup>-1</sup>) foram fornecidos pela ABCAM, fracionados e mantidos sob refrigeração a temperatura -20°C, em *freezer* adequado no LGPRD. A interação entre a *E. coli* ATCC 25922 e o anticorpo foi verificada através de microscopia de fluorescência por método imunológico, de acordo com Caravelli *et al.* (2013).

### 4.1.6 Liga amorfa magnetoelástica

A liga amorfa magnetoelástica 2823MB3 foi fornecida pela empresa americana Metglas. De composição Fe(45%)Ni(45%)Mo(7%)B(3%), apresenta magnetoestricção de saturação de 12 ppm, temperatura de Curie de 353°C, espessura em torno de 30 µm, densidade de 7,9 g.cm<sup>-3</sup>, módulo elástico de 100 – 110 GPa e temperatura de cristalização de 410 °C. A fita amorfa possui largura de 2 polegadas e está disposta em bobina (METGLAS, 2011).

## 4.2 CARACTERIZAÇÕES

### 4.2.1 Microscopia

A análise superficial dos sensores após corte e deposição de Cr/Au foi verificada em microscópio metalográfico B100 com óptica corrigida ao infinito, com sistema de polarização e câmera CCD, da marca Bioptika e com ampliação de até 1000 vezes. As amostras foram visualizadas no LCM.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

A microscopia das camadas de CYS aplicadas sobre os sensores foi realizada por microscópio TESCAN MIRA 3 MEVEC (FEG),  $bi \sim 7,00$  (*beam int.*),  $sz \sim 4$  nm (*spot size*), HV de 5 KV e WD de 5 mm (*work distance*). As amostras mantidas em dessecador por 24 horas, como indicado por Goldstein (2003). As amostras foram analisadas no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCMAT) da UCS.

A microscopia de fluorescência por método imunológico das bactérias imobilizadas sobre os biosensores foi verificada por microscópio de fluorescência Olympus BX3/BX53, com aumento de até 1000 vezes e fotos registradas pelo *software* Q-Capture em câmera CCD. A análise das amostras foi realizada no LGPRD.

### **4.2.2 Análise química por FTIR**

A análise dos desdobramentos moleculares N - H das camadas de CYS sobre o sensor, foram avaliadas em espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) Nicolet iS10, pelo modo ATR (*Attenuated Total Reflectance*) e os espectros compreendem a faixa de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . As amostras foram analisadas no Laboratórios de Polímeros (LPOL) da UCS.

### **4.2.3 Análise das frequências de ressonância**

A análise das frequências de ressonância dos biosensores ocorreu por analisador de redes E5061B HP/Agilent. As faixas de frequência e DC bias são particulares para cada sensor pois são propostas em função do comprimento específico de cada peça analisada. O analisador de redes (AR) apresenta gráficos de frequência de ressonância com 1600 pontos de resolução na escala, com subdivisões, e com marcadores pré-dispostos para informar valores específicos de picos de ressonância (Figura 26). Os valores de ressonância são captados do AR por intermédio do *software I/O Functions* e dispostos em planilha de Excel, podendo assim traçar curvas com os dados recolhidos. O AR possui ajustes que possibilitam a redução de ruído como o *Averaging* que faz médias de leituras (1 a 100) e o *smoothing* que suaviza as curvas para uma melhor visualização dos pontos de ressonância.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

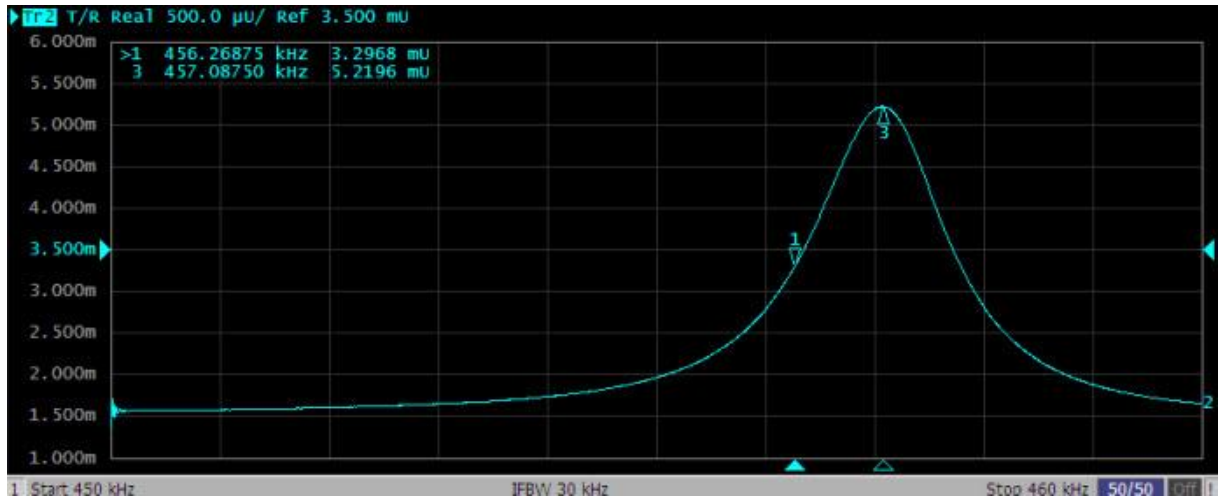


Figura 26. Medida de ressonância de sensor magnetoelástico de dimensão 5 mm x 1 mm, mostrando o marcador 3 no pico de frequência de ressonância (o autor).

Inicialmente foi montada uma bobina de Helmholtz (Figura 27) que necessitava de *Lock-in* (emissor de sinal elétrico) para enviar campos  $H_C$  e uma fonte para enviar campos  $H_{DC}$ . Com a chegada do analisador de redes, a análise foi simplificada ao uso de apenas um solenoide (*pick-up coil*) para a coleta de dados e aplicação da DC bias, propiciando a análise de sensores magnetoelásticos de pequenos comprimentos e altas frequências de ressonância (Figura 28).



Figura 27. Bobina de *Helmholtz* para leitura de sensores usando *Lock-in* e fonte (o autor).



Figura 28. *Pick-up coil* para análise de frequência de ressonância em meio líquido, suportando *Eppendorf* de 250  $\mu\text{L}$  (o autor).

#### **4.2.4 Contagem das bactérias**

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada através de diluição de base 10, a partir de cultura de bactérias em meio LB líquido, a 37°C e 24 horas de incubação com agitação (100 rpm). Cada diluição foi aplicada em placa de Petri com meio LB semissólido, a 37 °C e 24 horas de incubação, em volume de 10  $\mu\text{L}$  a 50  $\mu\text{L}$ , conforme a diluição (concentração de bactérias). Os crescimentos seguem em acordo com Sezonov *et al.* (2007).

#### **4.2.5 Polimento de sensores**

O polimento da superfície dos sensores foi executado por politriz Struers, modelo Tegramin 20, suporte para 4 amostras de 30 mm de diâmetro, rotores com velocidade de 150 rpm contra rotante e pressão de 10 N por área de amostra polida. A solução usada para o polimento foi Alumina Arotec 0,05  $\mu\text{m}$  em proporção 1:1 com água desmineralizada. O tempo de aplicação da solução foi de 5 em 5 segundos e o tempo de polimento foi de 1 hora e 30 minutos.

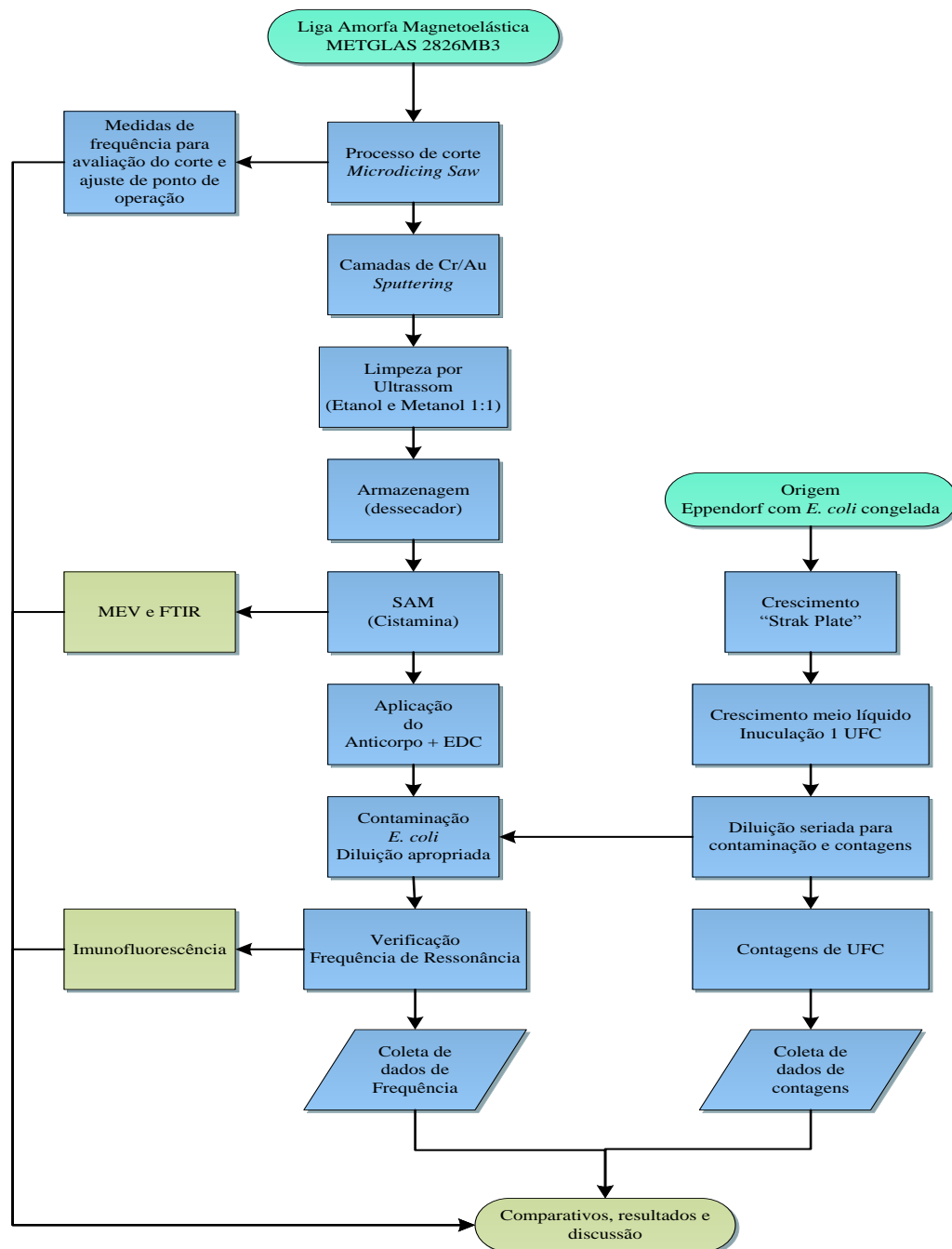


## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.3 METODOLOGIA

#### 4.3.1 Fluxograma do processo de fabricação dos biosensores e análise das frequências de ressonância das contaminações

A metodologia usada no processo de fabricação, o processo de crescimento das culturas de bactérias, a contaminação dos biosensores, caracterizações e análises de dados, estão demonstrados no fluxograma a seguir:



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **4.3.2 A escolha do tipo de sensor magnetoelástico**

A metodologia proposta para a montagem do biosensor é iniciada pela escolha da liga amorfa magnetoelástica. A fita de liga amorfa METGLAS 2826MB3 é de fácil magnetização, de propriedades físicas e magnéticas bem definidas. A espessura da fita (em torno de 30  $\mu\text{m}$ ) também favorece o dimensionamento do transdutor e, caso ocorra necessidade de maior sensibilidade, a fita amorfa pode ser polida para redução de espessura e melhor uniformidade da superfície. Como a fita amorfa possui diferentes topografias no lado superior e inferior, os processos foram testados em ambos lados e com polimento das superfícies. De acordo com as informações mostradas pelo fornecedor, a liga amorfa em estado de fábrica (*as cast*) possui boa permeabilidade a campo DC mas pode ser melhorada com tratamento térmico, de acordo com as informações técnicas. Todos esses fatores implicaram na escolha da liga amorfa em questão para o uso na montagem de biosensores.

### **4.3.3 Corte em micro serra da fita magnetoelástica para dimensionamento dos sensores magnetoelásticos**

Para a análise de bactérias *in situ*, a fita de liga amorfa que apresenta largura de 2 polegadas foi dimensionada em tamanho que dispõe possibilidade de manipulação e possua ao mesmo tempo uma boa sensibilidade para bactérias. A liga amorfa foi encaminhada para o Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), em Campinas – SP, para o processo de corte com serra *microdicing saw*, sob supervisão de Giuliano Maiolini.

### **4.3.4 Deposição das camadas de Cr e Au sobre o sensor magnetoelástico**

Após o dimensionamento provido pelo corte, para a funcionalização da superfície com cistamina, há necessidade aplicar uma camada de Au para a ligação. Essa camada de Au sobre a liga amorfa requer uma camada intermediária de Cr para melhorar a interface de acoplamento entre as duas camadas. A aplicação das camadas de Cr e Au sobre a superfície da liga amorfa foi processada sob supervisão do professor Antônio Domingues dos Santos e o engenheiro Sérgio Romero, ambos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.3.5 Armazenamento dos sensores magnetoelásticos

Após aplicação das camadas de Cr e Au, o sensor está pronto para a formação das SAM na superfície. Os sensores são destacados do substrato polimérico de cura UV e lavados em ultrassom com solução de Etanol / Metanol 1:1. Em seguida, os sensores magnetoelásticos são armazenados em dessecador (Figura 29) ou em solução de Metanol para evitar umidade e consequente corrosão da superfície não coberta com as camadas Cr e Au, para evitar contaminações.

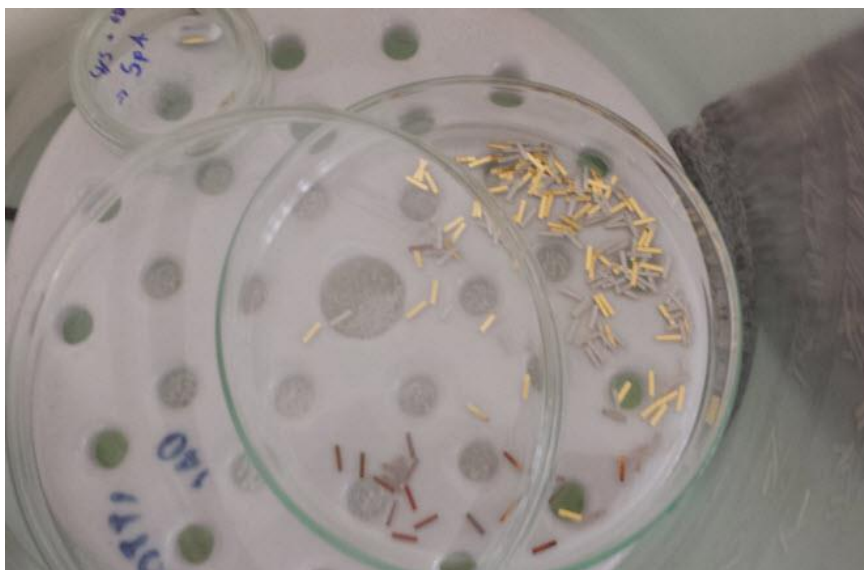


Figura 29. Sensores magnetoelásticos com camadas Cr e Au armazenados em dessecador para evitar umidade e corrosão (o autor).

### 4.3.6 Formação da SAM com soluções de cistamina

A aplicação da cistamina para a formação das SAM é feita em meio líquido, em solução de Etanol / Água 9:1, com concentração de 20 mM durante 24 horas. Antes do uso, o sensor é lavado com a solução Etanol / Água 9:1 para remoção das moléculas de cistamina não ligantes.

### 4.3.7 Aplicação do anticorpo sobre as SAM de cistamina

A diluição do Ac é procedida em PBS pH 7,4 para concentração de  $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$  (1:50). Em sequência é adicionado EDC 20 mM, em proporção de 1:100 com o anticorpo, incubado a  $25^\circ\text{C}$  por 2 horas em estufa com agitação de 100 rpm. Após a aplicação do anticorpo,

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

o biosensor é lavado com PBS pH 7,2 para remover ligações não específicas. O anticorpo pode se mostrar não específico para as bactérias alvo, por isso a escolha do anticorpo e o conhecimento da bactéria são fundamentais para uma detecção adequada. Para a microscopia de fluorescência por método imunológico, a diluição do anticorpo secundário Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488 foi de 0,008 mg.mL<sup>-1</sup> (1:125), mesma diluição usada para a fluorescência dos biosensores contaminados, por método imunológico. O protocolo usado para o uso de CYS, EDC e anticorpos segue em adaptação à metodologia de Hermanson (2008c).

### **4.3.8 Análise das frequências de ressonância**

Como último passo da metodologia, o biosensor é introduzido em um *Eppendorf* de 250 µL e contaminado com a suspensão de bactérias. No tempo inicial é verificado o valor da frequência de ressonância e registrado como valor Zero. As leituras a seguir são tomadas em intervalos de 10 minutos até completar 100 minutos de análise. A frequência de ressonância verificada no equipamento deve ser menor do que a anterior, o que corresponde ao  $-\Delta f$ . Os valores de  $-\Delta f$  são convertidos em bactérias considerando peso e dimensão do organismo usado no teste.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DOS SENSORES MAGNETOELÁSTICOS E AJUSTES DE PONTO DE OPERAÇÃO

A fita de liga amorfa foi processada em duas dimensões distintas: a primeira dimensão foi de 5 mm de comprimento e 1 mm de largura, a segunda dimensão foi de 2 mm de comprimento e 0,4 mm de largura (Figura 30), mas somente a primeira dimensão foi testada. A fita amorfa foi estabelecida sobre substrato polimérico adesivo específico para corte de *wafers* de silício, chamado ELP NBD-5170K *Cutting Tape Type UV curable*. A vantagem de usar a fita de cura UV como substrato é de não ficar resíduos no material a ser cortado. O processo de dimensionamento através do corte por micro serra se mostrou mais eficiente em comparação ao corte a laser, que apresenta superaquecimento nas laterais dos sensores causando a cristalização da liga amorfa, desta forma, perdendo as propriedades magnéticas (Figura 31).

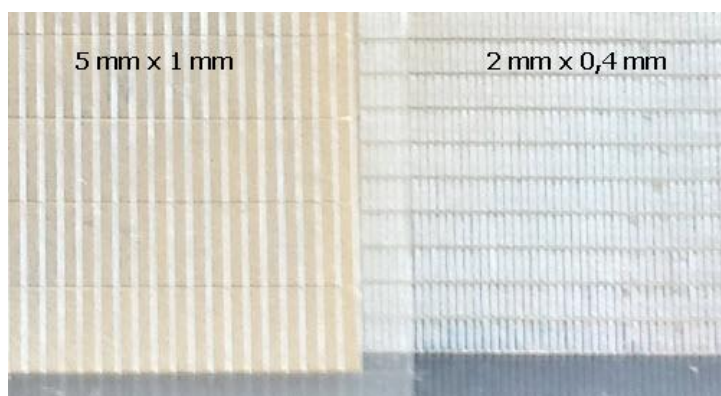


Figura 30. Corte da fita amorfa magnetoelástica (dimensões 5 mm x 1 mm e 2 mm x 0,4 mm) processada em serra *microdicing saw* e suportada em substrato polimérico de cura UV (o autor).

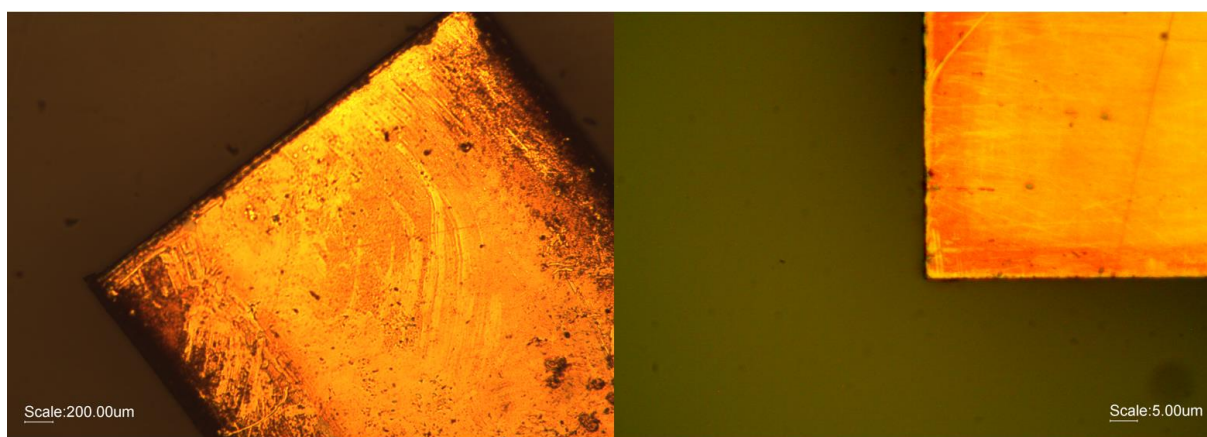


Figura 31. Comparativo entre tipos de corte. A primeira micrografia mostra um sensor com corte a laser e o segundo cortado por serra *microdicing saw* (o autor).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras da liga amorfa cortadas em dimensão específica foram previamente aplicadas em banho ultrassônico com metanol, para remover resíduos de contaminantes e posteriormente encaminhadas para a deposição de Cr e Au via *sputtering*.

As espessuras das camadas depositadas variaram em torno de 130 nm para o Cr e 115 nm para o Au, conforme análise RBS (*Rutherford Backscattering Spectroscopy*) provido pelo IFUSP (Figura 32).

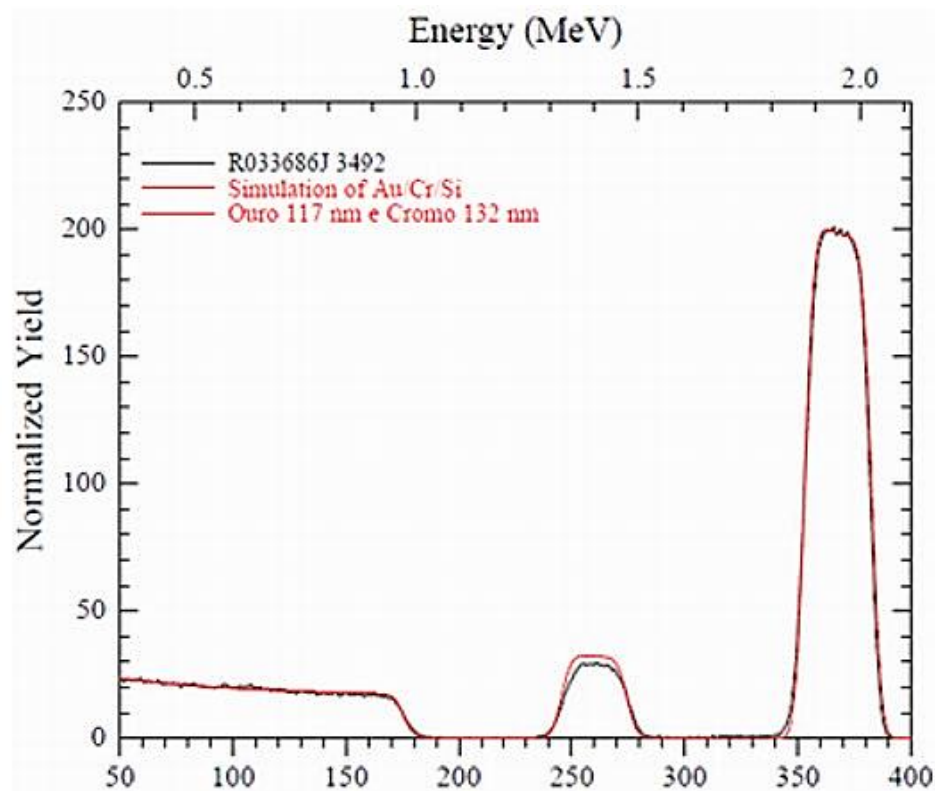


Figura 32. Espectro RBS das camadas de Cr e Au depositadas sobre superfície de Silício (Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP)).

Depois do procedimento de corte das fitas, seguiram para o processo de deposição de Cr e Au. Algumas fitas foram posicionadas de forma o qual o lado de superfície liso (lado voltado para a atmosfera no processo de formação da fita amorfa) estivesse voltado para cima, para receber as camadas de Cr e Au (Figura 33, coluna a).

Outras amostras, pelo contrário, foram posicionadas com o lado rugoso para cima (lado voltado para a roda de conformação no processo de produção da fita amorfa) antes do processo de recobrimento das camadas de Cr e Au (Figura 33, coluna b).

Após executarmos o polimento das superfícies da fita magnética, a amostra foi enviada para a deposição de Cr e Au e posteriormente para o corte dimensional, executando procedimento inverso às fitas anteriores (Figura 33, coluna c).



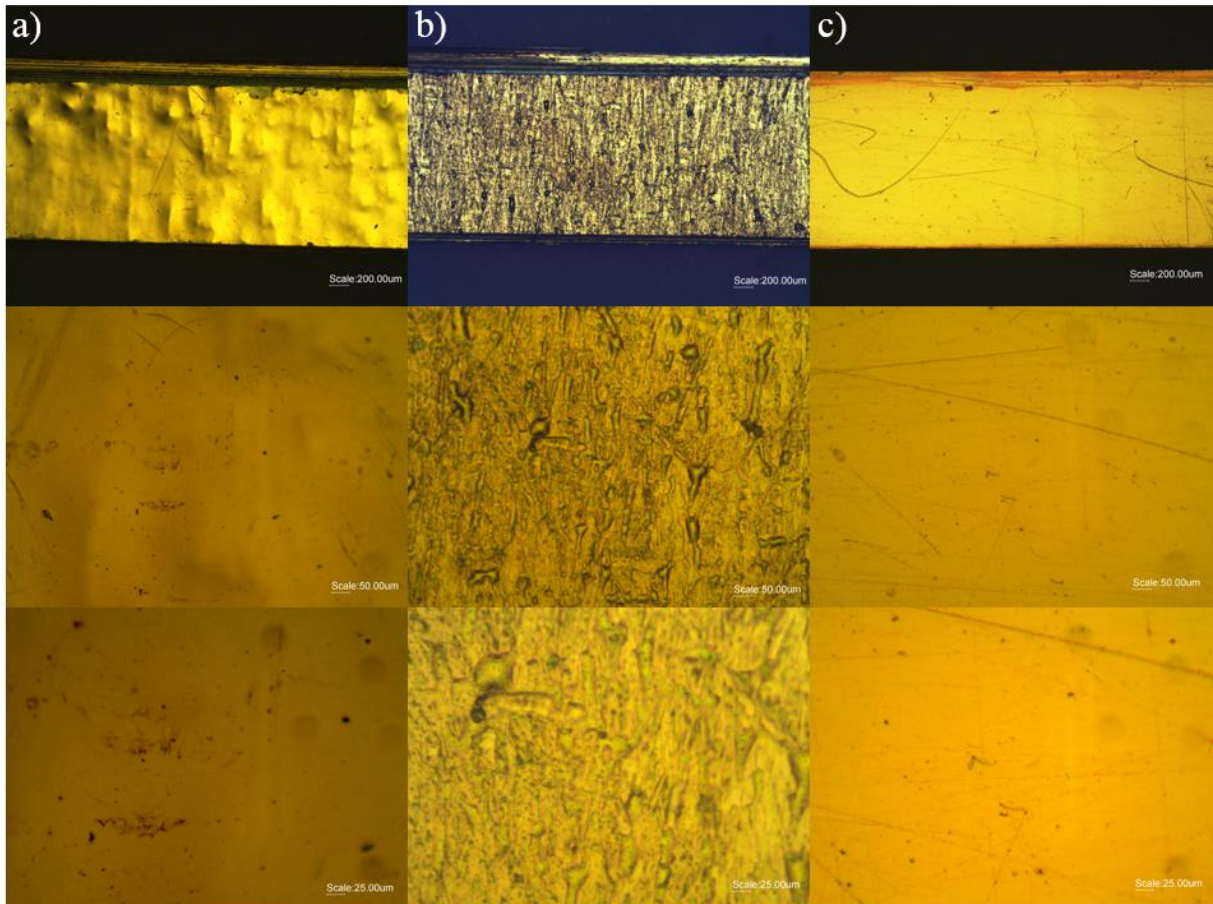


Figura 33. Comparativo entre as 3 superfícies testadas nas montagens dos biosensores. A coluna “a” representa o sensor liso, a coluna “b” representa o sensor rugoso e a coluna “c” representa o sensor polido (o autor).

Na Figura 33 coluna “a”, é verificada uma superfície lisa mas com grandes aclives espaçados. Essa superfície pode propiciar um acoplamento das moléculas de CYS, entretanto, os aclives espaçados podem prejudicar o acoplamento. O lado liso ainda é bastante acidentado e pode ser melhorado com polimento da superfície antes da deposição de Cr e Au.

É notado na Figura 33 coluna “b” que a superfície é rugosa, mostrando uma topografia acidentada proveniente do processo de fabricação da liga amorfa. Como pode ser visualizado, essa superfície rugosa indica que há bolhas de ar aprisionadas entre o material fundido e a roda de conformação, durante o processo de fabricação da liga amorfa. Outro ponto mostrado na Figura 33 coluna “b” é a grande quantidade de sobras que ficaram após o destacamento do sensor do substrato polimérico usado no corte em micro serra e posterior cobrimento com Cr e Au. Essas sobras que se apresentam nas laterais dos sensores podem mudar a área e consequentemente o ponto de operação, causando variações nas leituras. Em termos de deposição de CYS, pode dificultar um bom acoplamento.

A Figura 33 coluna “c” mostra um sensor magnetoelástico que foi polido e coberto com Cr e Au e posteriormente enviado para o corte, fazendo o processo contrário, a fim de obter

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

melhoramento nas laterais dos sensores e facilitar o destacamento das amostras posicionadas sobre o substrato polimérico. Melhoramentos na superfície foram identificados, não somente para obter uma superfície planar de baixa rugosidade, mas também de fácil destacamento das peças do substrato polimérico usado no corte em micro serra. Sobras de material nas laterais das peças foram minimizadas. Com maiores magnificações notamos que o sensor liso e o sensor polido possuem superfícies semelhantes, o que sugere que o polimento removeu os aclives espaçados, mas não melhorou muito em termos de espelhamento.

Com a análise de imagens de fundo plano (*flat fielding*) podemos evidenciar as semelhanças e diferenças entre as superfícies testadas, para fundamentar que o sensor de superfície lisa e polida são muito parecidos, sendo o sensor polido sem aclives espaçados (Figura 34).

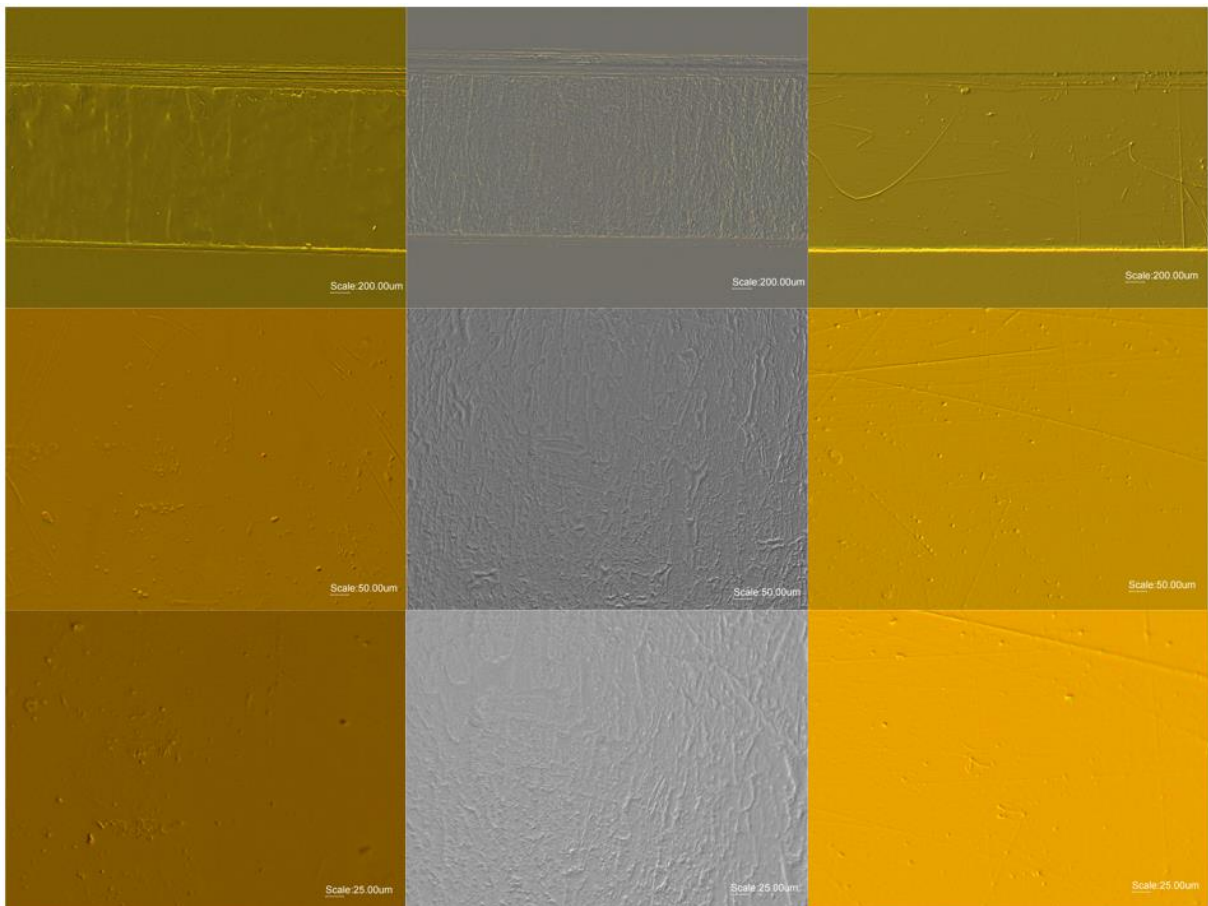


Figura 34. Comparativo entre as 3 superfícies testadas nas montagens dos biosensores, com imagens ajustadas para fundo plano.

Como verificado nas microscopias anteriores, as imagens mostraram menores variações de topografia para o sensor liso e polido. Desta forma, foi avaliado a rugosidade da superfície da fita magnetoelástica (Figura 35). A amostra de fita magnetoelástica foi



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

posicionada sobre uma superfície de aço liso e plano e a ponteira do equipamento de rugosidade foi baixada. A análise de rugosidade foi feita no Laboratório de Mecânica (LAMEC) da UCS, com rugosímetro Mitutoyo SJ-301 SRT N. 178.

Os parâmetros fornecidos pelo equipamento são o Ra que apresenta a rugosidade média de um perfil desde a sua linha média, sobre um comprimento medido, o Ry que demonstra a distância entre o pico mais alto e o vale mais baixo dentro de um comprimento medido e o Rz que apresenta a distância média entre os 5 picos mais altos e os 5 vales mais baixos (GRIFFITHS, 2003).

Ambos lados da fita foram avaliados e uma fita que foi processada por politriz também foi avaliada.

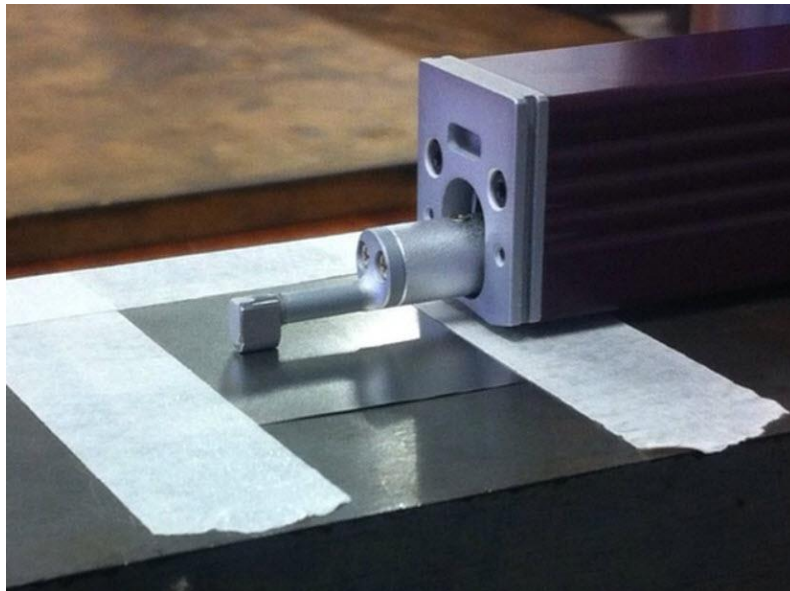


Figura 35. Avaliação da superfície da fita magnetoelástica em rugosímetro (LAMEC)

A Tabela 5 mostra os valores de rugosidade das superfícies da fita magnetoelástica para produção de biosensores magnetoelásticos para detecção e quantificação de *E. coli*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5. Valores de rugosidade da superfície da fita magnetoelástica mostrando os parâmetros Ra, Ry e Rz.

Superfícies	Ra ( $\mu\text{m}$ )	Ry ( $\mu\text{m}$ )	Rz ( $\mu\text{m}$ )
Lisa	0,39	3,19	2,60
Rugosa	0,52	9,60	5,08
Polida	0,30	5,25	2,78

Como visto na Tabela 5, o menor valor de rugosidade média foi verificado para a superfície polida, mas próximo do valor médio encontrado para a superfície lisa. A superfície rugosa mostrou valores de rugosidade média 42% maior que a polida, de acordo com os valores de Rx. A distância entre os picos mais altos e os vales mais baixos foram encontrados na superfície da fita de lado rugoso, como apresentado pelo valor de Ry. Outro dado complementar (Rz) informa que as superfícies lisa e polida possuem valores semelhantes para a distância média entre os 5 picos mais altos e os 5 vales mais baixos, afirmando o que vimos nas imagens de microscopia das superfícies.

Os resultados apontam que a redução da rugosidade da superfície da fita magnetoelástica é essencial para a melhoria do método e uma maior captação de bactérias, supondo que uma superfície planar e de baixa rugosidade pode formar uma camada de CYS mais compacta e resultar em um melhor acoplamento com o anticorpo.

Os melhores resultados nas avaliações de leituras de frequência de ressonância juntamente com o método de aplicação de cistamina e anticorpos, indicam que este procedimento, contemplando polimento das superfícies, o cobrimento da fita amorfa com Cr e Au e posterior corte dimensional, deve ser seguido para redução de variações e possível padronização dos biosensores magnetoelásticos para detecção e quantificação.

Após o processo de fabricação dos sensores magnetoelásticos, através das etapas do corte dimensional da fita magnetoelástica e posterior cobrimento com camadas de Cr e Au, foram testados para averiguar as frequências de ressonância de cada peça e ajuste dos parâmetros de leitura do analisador de redes.

Os parâmetros usados para a análise e dados teóricos de frequência de ressonância fundamental são o módulo de elasticidade (105 GPa), coeficiente de Poisson (0,33), dimensão (5 mm x 1 mm x 30  $\mu\text{m}$ ), e a massa específica da liga magnetoelástica (7900 kg m<sup>-3</sup>). O valor

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

de frequência de ressonância teórico produzido com os parâmetros propostos foi de 445KHz para um sensor magnetoelástico de 5 mm de comprimento. Antes da medição da frequência de ressonância das peças de sensores magnetoelásticos, as amostras foram lavadas em ultrassom com etanol absoluto e mantidas em dessecador por 2 horas. Após a lavagem, a medição da frequência de ressonância foi executada para cada peça de sensor magnetoelástico (Figura 36).

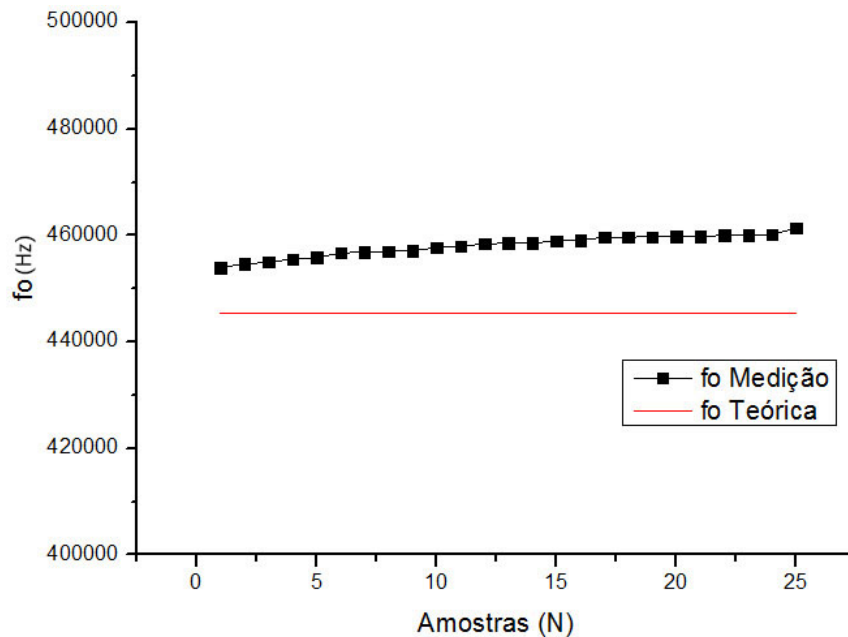


Figura 36. Avaliações de frequências de ressonância de sensores magnetoelásticos (o autor).

A média das frequências de ressonância entre as peças avaliadas é de  $458110 \pm 2,0$  Hz para a amostragem. A diferença dos resultados da avaliação em comparativo com a frequência de ressonância teórica, apresenta um valor de 12,7 KHz. Entretanto, como o interesse é a medição relativa das frequências de ressonância, essa diferença de frequência não foi considerada.

Para visualização do ponto de frequência de ressonância do sensor magnetoelástico foi necessário o ajuste da DC bias no analisador de redes. A variação da voltagem DC bias implica em diferentes valores do pico de ressonância do sensor magnetoelástico, devido ao efeito  $\Delta E$  previsto por Livingston (1982) e Squire (1990).

Como avaliado por Tormes *et al.* (2014), o pico de frequência de ressonância indica um valor de amplitude máxima e subtraindo do valor inicial (linha base), obtemos o delta da amplitude. Quando o valor do delta da amplitude é máximo em função do valor da DC bias, temos o ponto de operação para a análise de frequência de ressonâncias dos sensores magnetoelásticos, como mostrado na Figura 37 para sensores de 5mm de comprimento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

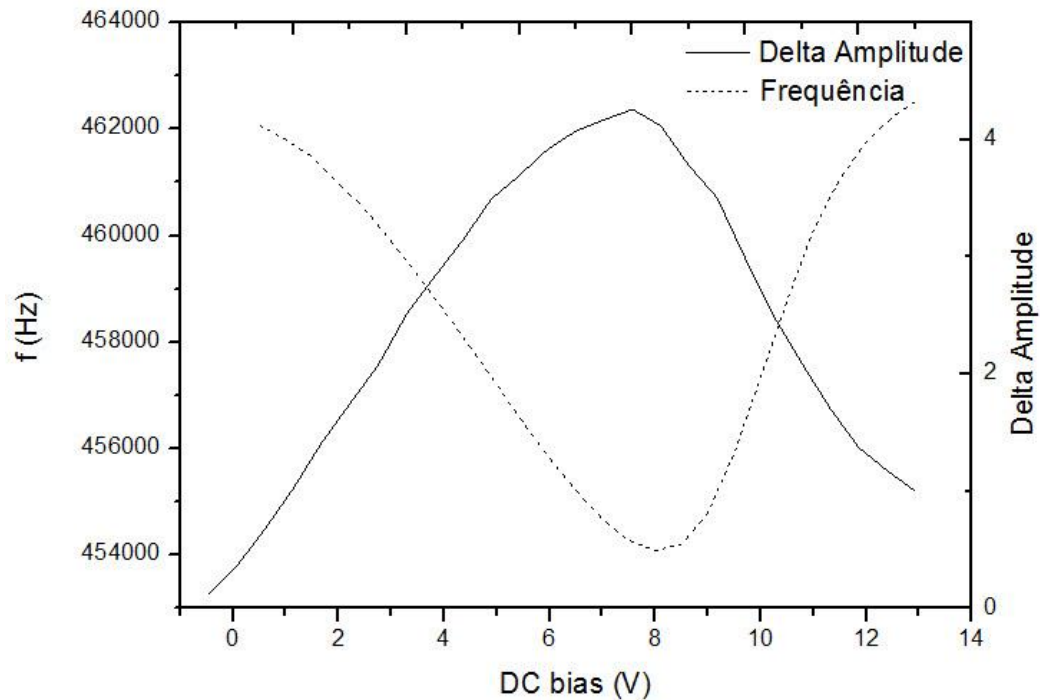


Figura 37. Frequências de ressonância e o delta da amplitude em função da DC bias (o autor).

As frequências de ressonância e o delta da amplitude possuem valores extremos em torno de 8V para o ajuste de DC bias no analisador de redes, indicando um ponto de operação neste valor. Esse ajuste é essencial para a avaliação das frequências de ressonância dos sensores magnetoelásticos pois este ponto verifica um alto valor na amplitude e define o pico de ressonância.

A avaliação da frequência de ressonância dos biosensores magnetoelásticos em meio líquido é uma alternativa de medição em relação a amostra aferida no ar, pois as bactérias alvo estão dispostas em soluções específicas feitas por diluição seriada. Quando o biosensor é colocado em meio líquido, um grande amortecimento na amplitude é verificado, e também, um deslocamento na frequência de ressonância (Figura 38).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

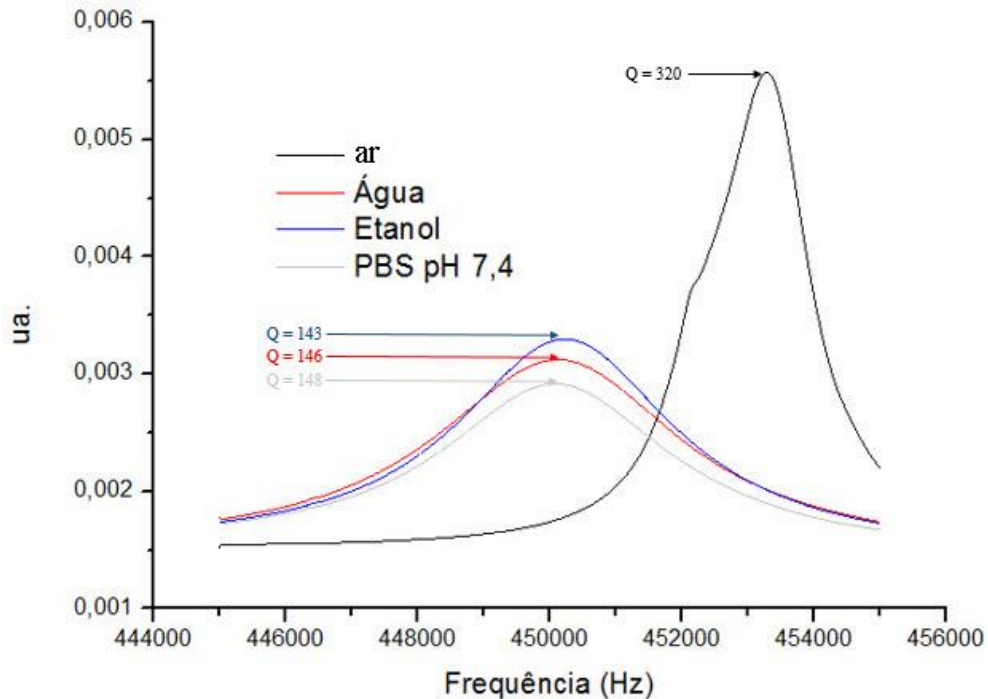


Figura 38. Variações de frequências de ressonância e amplitude em ar e em diferentes meios líquidos de análise, avaliadas no sensor liso (o autor).

Wen *et al.* (2010) encontram uma amplitude em água de 37% da amplitude em ar, para um sensor de dimensão 1 mm x 0,2 mm x 30  $\mu$ m. Para um sensor de dimensão 2 mm x 0,4 mm x 30  $\mu$ m, o valor sobe para 66%. O valor encontrado para a amplitude, nos sensores usados nos ensaios, é de 60% da amplitude em ar.

O amortecimento causado pela mudança do meio, de ar para aquoso, implicou em uma redução do *Q-factor* dos sensores magnetoelásticos usados nos ensaios. Em termos médios, a redução percentual no *Q-factor* do sensor magnetoelástico em soluções aquosas foi de 46% em relação ao *Q-factor* do ar.

### 5.2 A PRODUÇÃO DO BIOSENSOR MAGNETOELÁSTICO, CONTAMINAÇÃO E AVALIAÇÕES DE DESEMPENHO

Para iniciar o procedimento de diluição seriada, a bactéria *E. coli* foi repicada da amostra original armazenada em freezer a -20°C, para uma placa de Petri com meio LB semi-sólido.

Após 24 horas de crescimento em estufa a 37°C, várias unidades de colônias foram criadas. Foi utilizada 1 unidade formadora de colônia para inoculação em 100 mL de meio LB.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cepa de *E. coli* ATCC 25992 possui crescimento característico (Figura 39), como informado por Ma *et al.* (2014).

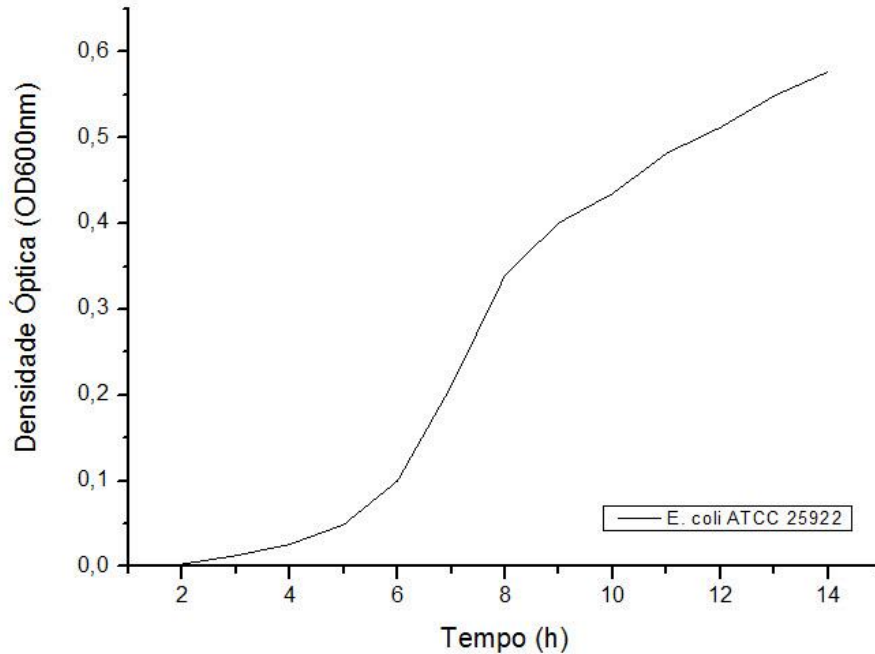


Figura 39. Crescimento característico da *E. coli* ATCC 25922 com concentração de  $6,9 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> após 14 horas em meio LB (o autor).

O concentrado de bactérias seguiu para a diluição seriada com PBS pH 7,4. A diluição seriada, iniciou com diluição de 1 mL de bactérias *E. coli* para 9 mL de solução PBS pH 7,4, a partir da suspensão concentrada de bactérias. A diluição seriada foi feita até a escala  $1 \cdot 10^{-6}$ . Foram aplicados 50  $\mu$ L de amostra de diluição para cada placa de Petri com meio LB semissólido e para cada análise foi feita suspensões novas. A contagem da diluição seriada mostrou uma concentração de bactérias de  $2,93 \cdot 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> para a solução de *E. coli* concentrada 1:1 para as avaliações dos sensores de superfície lisa,  $1,82 \cdot 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> para a superfície rugosa e  $0,5 \cdot 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> para a superfície polida.

Para avaliar o tempo de deposição da CYS sobre a superfície do sensor magnetoelástico coberto com Cr e Au, foi aplicada uma solução com concentração de 20mM de CYS, com volume de 250  $\mu$ L. Após, em tempos regulares, foram analisadas as superfícies dos sensores por FTIR. Assim, os tempos de aplicação de CYS foram avaliados e a Figura 39 mostra o estiramento N – H da molécula em uma solução de Etanol / Água 9:1. Espectro semelhante foi encontrado pôr Huang e Lee (2008) na análise da CYS em FTIR. Em torno de 2 horas de aplicação da solução de CYS sobre o sensor magnetoelástico, o consumo da CYS presente no solvente é similar ao de 4 horas (Figura 40). Isso justifica o que foi mostrado por

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cancino (2008), que indica que a SAM tem crescimento caótico e desordenado em até 2 horas e posterior compactação lenta em até 24 horas. A região de comprimento de onda de  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$  mostra o estiramento da ligação N – H primária, presente na extremidade da molécula de CYS, como sugerido por Ferreira *et al.* (2009).

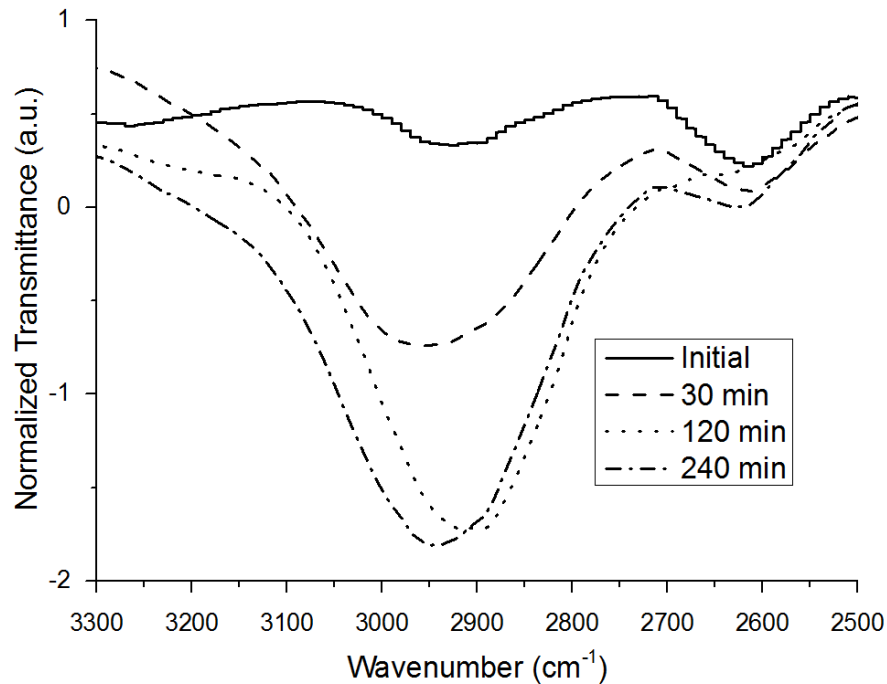


Figura 40. Espectro de FTIR das superfícies com aplicação de CYS (concentração de 20 mM) para a formação da SAM (o autor e LPOL).

Para a verificação da superfície do sensor com a formação da SAM de CYS foi realizado micrografias FEG. A Figura 41 mostra a superfície de um sensor polido com cobertura de Cr e Au sem CYS e a característica topográfica do fundo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

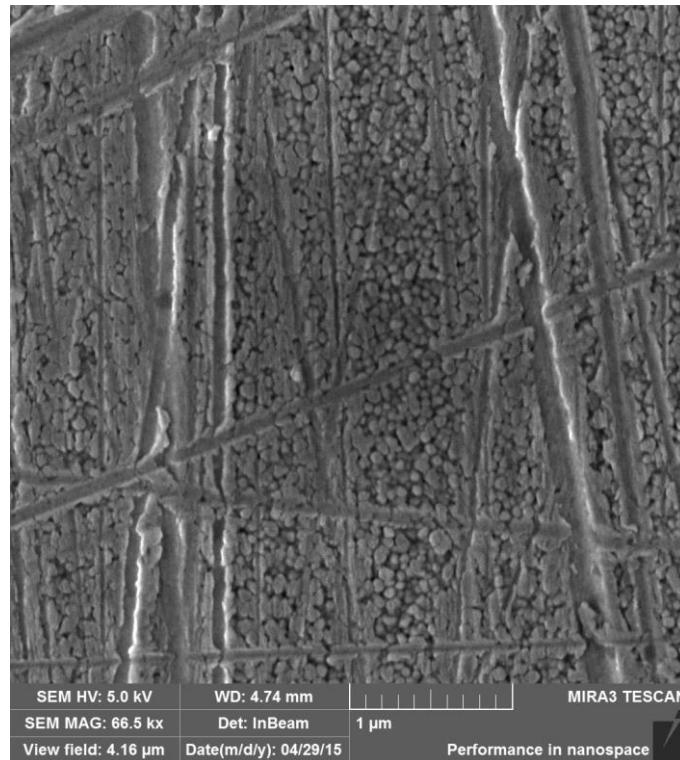


Figura 41. Micrografia FEG da superfície de sensor polido e coberto com Cr e Au.

Como verificado na imagem, o fundo é caracterizado por grãos menores que 100 nm de diâmetro. Outra particularidade da topografia são os riscos deixados pelo processo de polimento, o que reforça ainda mais a aparência similar entre o sensor liso e polido, quando visto em maiores magnificações. A solução de alumina usada no processo de polimento possuía diâmetro médio de partículas de 0,05 µm, de fato, a largura dos riscos proveniente do polimento tem uma largura em torno de 0,1 µm para valores maiores, como verificado na imagem. Isto sugere que a solução de Alumina pode ter aglomerado e outro tipo de solução com menor diâmetro de partícula deve ser considerado, visando a melhoria no processo de polimento da superfície.

Na escolha de uma superfície melhorada, executamos a microscopia FEG da superfície do sensor polido, avaliando tempos diferentes de aplicação da CYS. A Figura 42 apresenta a superfície de um sensor magnetoelástico de superfície polida com 30 minutos de aplicação de CYS com concentração de 20 mM.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

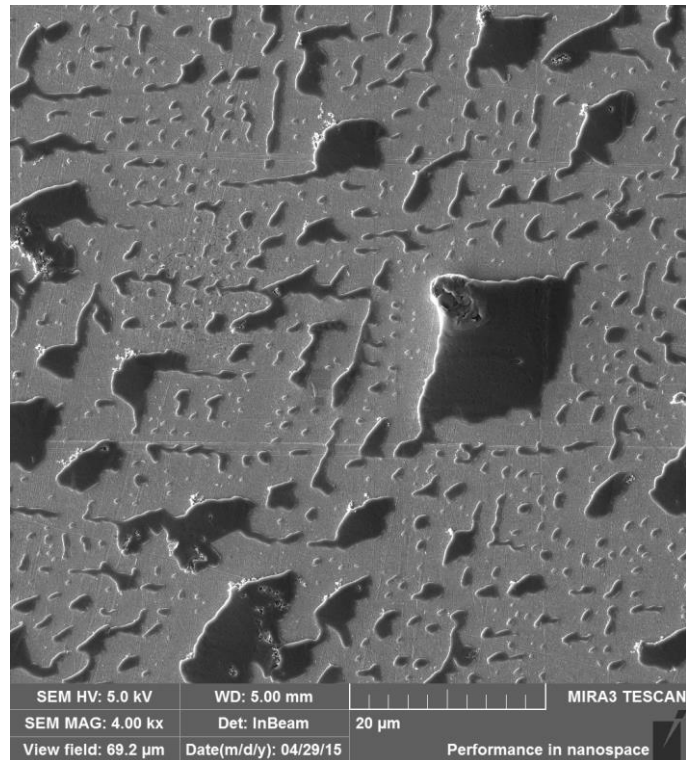


Figura 42. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 30 minutos e magnificação de 4000 vezes.

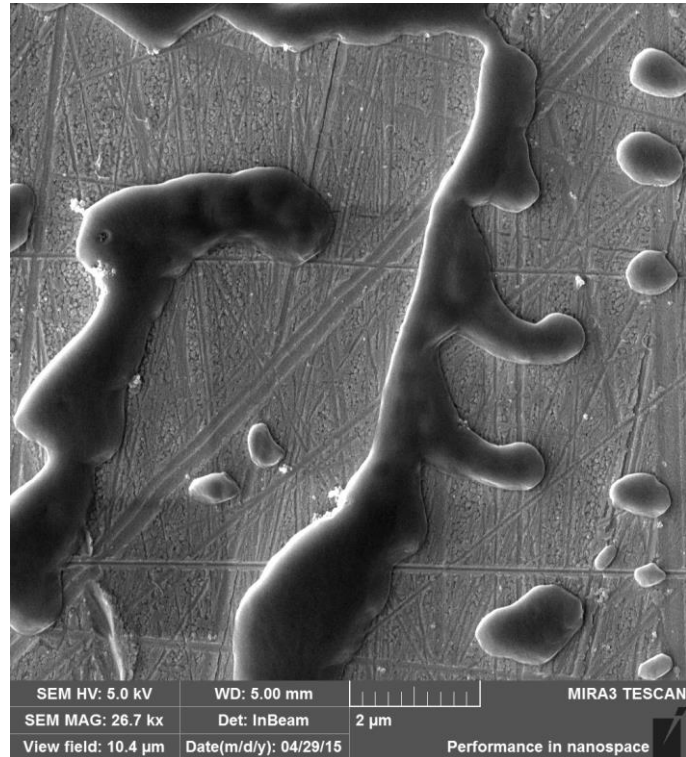


Figura 43. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 30 minutos e magnificação de 27600 vezes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como verificado na Figura 43, aglomerados menores que 250 nm estão presentes na superfície do sensor, entretanto, há bastante vacâncias que necessitam de preenchimento. Também é verificado grandes placas de CYS que podem aumentar com um maior tempo de aplicação e preenchendo as vacâncias relacionadas ao tempo de 30 minutos de aplicação. Um melhor preenchimento dessas vacâncias melhorará a eficiência do biosensor.

Avaliando a superfície de um sensor magnetoelástico coberto com Cr e Au e 120 minutos de aplicação de CYS (Figura 44), é notável o crescimento da cobertura, preenchendo grande parte das vacâncias que haviam sido mostradas anteriormente nas micrografias de aplicação de 30 minutos de CYS.

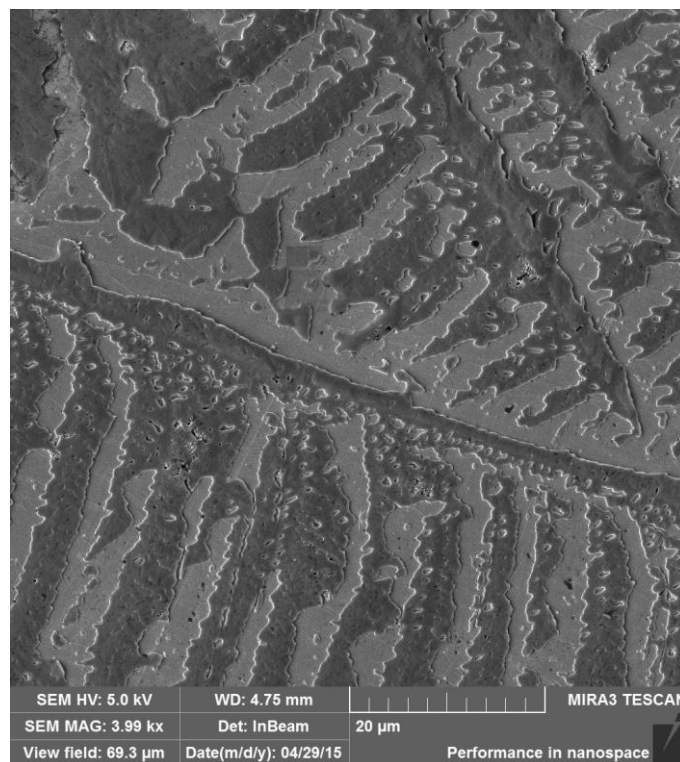


Figura 44. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 120 minutos e magnificação de 4000 vezes.

É perceptível a presença de aglomerados de tamanhos em torno de 250 nm, como verificados em outros trabalhos por Cancino (2008) e Zhou *et al.* (2011). Com uma maior magnificação (Figura 45) podemos notar o contraste entre o fundo do sensor e as grandes placas compactas de CYS que foram formadas sobre a superfície e, desta forma, fica evidente que um melhoramento mais refinado da superfície do biosensor é necessário, além do polimento que já foi executado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

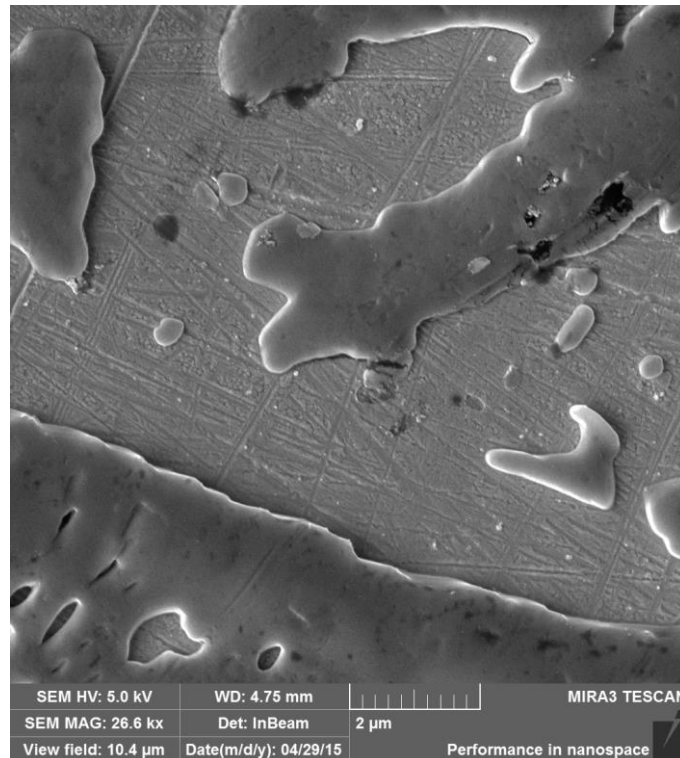


Figura 45. Microscopia FEG da superfície de sensor magnetoelástico polido, coberto com Cr e Au e aplicação de CYS com concentração de 20 mM. Tempo de aplicação de CYS de 120 minutos e magnificação de 26600 vezes.

Os sensores magnetoelásticos cobertos com Cr e Au foram colocados no interior de *Eppendorf* de 250  $\mu\text{L}$  e uma solução de 20 mM de CYS foi adicionada. Para a formação da SAM com boa compactação, o tempo de aplicação de CYS foi de 24 horas a temperatura ambiente. Após esse processo, os sensores foram lavados por três vezes com o meio diluente da CYS (Etanol / Água 9:1), para remover excessos.

Com o biosensor montado, contemplando a SAM de CYS e executando o protocolo de aplicação de anticorpos mediados por EDC, indicado por Hermanson (2008c), foram testados 5 biosensores nas mesmas condições e com diluição de contaminação de bactérias de  $1.10^{-1}$ , a partir do concentrado de bactérias inicial. O tempo avaliado foi de 100 minutos. A Tabela 5 mostra os dados de  $\Delta f$  coletados e os desvios (S) de cada variação analisados em relação a amostra de sensor liso. A Tabela 6 apresenta os dados coletados e a Figura 46 mostra as curvas de leituras de  $\Delta f$  para os 6 biosensores de superfície lisa, juntamente com o sensor branco.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6. Coleta de dados de  $\Delta f$  informando as variações dos 5 biosensores lisos testados nas mesmas condições de montagem e contaminação.

Tempo (min)	$\Delta f$					Média $\Delta f$ (Hz)	S (Hz)
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5		
0	0	0	0	0	0	0	0
10	93,75	75,00	5,25	93,63	101,25	73,78	27,41
20	132,50	131,25	17,25	133,75	135,00	109,95	37,08
30	190,50	197,50	123,00	162,50	169,50	168,60	20,68
40	193,50	206,25	127,90	190,00	196,75	182,88	21,99
50	200,75	206,25	148,25	195,38	202,00	190,53	16,91
60	208,75	212,50	162,17	192,88	197,50	194,76	13,79
70	210,75	206,25	187,50	194,88	199,50	199,78	6,98
80	210,75	214,75	208,58	196,47	200,00	206,11	6,30
90	214,25	206,25	205,25	192,88	201,50	204,03	5,47
100	222,50	209,75	214,00	194,88	200,25	208,28	8,57

É notado que há bastante variação de  $\Delta f$  nos tempos até 60 minutos e um possível aprimoramento poderia ser feito com um polimento na superfície do sensor, o polimento do sensor facilitaria a deposição de cistamina com melhor compactação e posterior ligação com os anticorpos.

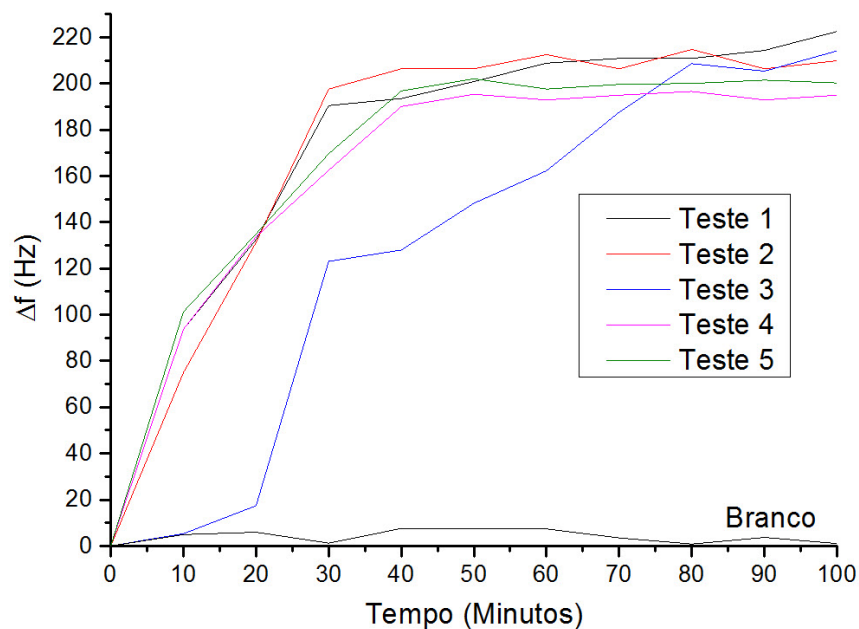


Figura 46. Curvas de  $\Delta f$  dos 5 biosensores de superfície lisa, juntamente com o sensor branco (Origin 9.0).

A partir da sensibilidade de massa ( $S_m$ , Equação 6) do biosensor e supondo a massa de uma unidade de bactéria *E. coli* ( $1.10^{-15}$  kg), a razão entre estes dois parâmetros nos informa a

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

sensitividade aproximada por bactéria, como proposto por Horikawa (2013). Dividindo os valores da média de  $\Delta f$  coletados nos biosensores pela sensibilidade por bactéria, conseguimos aproximar valores em unidades de bactérias captadas pela dimensão do sensor magnetoelástico (HORIKAWA, 2013). A Tabela 7 mostra os valores de média de  $\Delta f$  convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão do biosensor.

Tabela 7. Valores de  $\Delta f$  convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão lisa de biosensor utilizado nos ensaios de detecção e quantificação.

Tempo (min)	Média $\Delta f$ (Hz)	S (Hz)	Concentração (bactérias)	S (bactérias)
0	0	0	0	0
10	73,78	27,41	3,9E+05	1,4E+05
20	109,95	37,08	5,8E+05	1,9E+05
30	168,60	20,68	8,9E+05	1,1E+05
40	182,88	21,99	9,6E+05	1,2E+05
50	190,53	16,91	1,0E+06	8,9E+04
60	194,76	13,79	1,0E+06	7,4E+04
70	199,78	6,98	1,1E+06	3,7E+04
80	206,11	6,30	1,1E+06	3,2E+04
90	204,03	5,47	1,1E+06	2,6E+04
100	208,28	8,57	1,1E+06	4,2E+04

A partir dos valores obtidos é possível estimar a contagem de bactérias captadas pela superfície do biosensor magnetoelástico. Nota-se que até 40 minutos de análise há alta taxa captação de bactérias, e posterior a este tempo, é mostrado uma atenuação na taxa de captação, também chamada de saturação da superfície funcionalizada do biosensor magnetoelástico. Verifica-se também altos valores de desvio padrão (S) nos tempos iniciais de avaliação. Isso pode ser explicado pela variação na ativação dos anticorpos na superfície e disposição das bactérias, *stress* biológico, variações de temperatura e a topografia da superfície dos biosensores usados (MCKENZIE *et al.*, 2014; PERCIVAL e WILLIAMS, 2014).

A Figura 47 mostra duas avaliações de taxa de ligação da bactéria *E. coli* na superfície do biosensor magnetoelástico. A primeira taxa é verificada em até 40 minutos e a segunda taxa é verificada de 40 a 100 minutos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

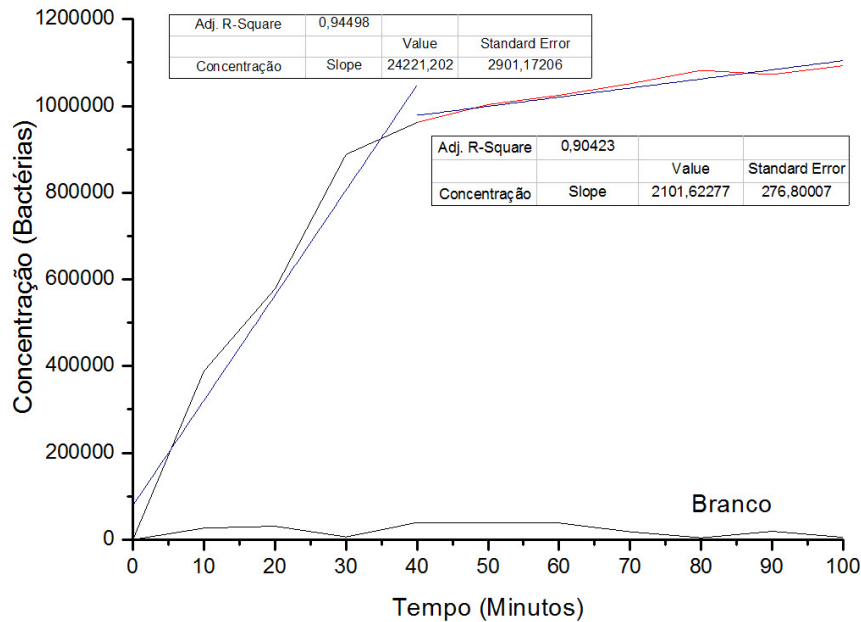


Figura 47. Avaliação da taxa de ligação entre a *E. coli* e a superfície do biosensor magnetoelástico.

A correlação linear da análise da primeira taxa de até 40 minutos mostrou um coeficiente de correlação linear de  $r^2 = 0,95$  e a inclinação da reta (*slope*) indicou uma taxa de  $2,42 \cdot 10^4$  bactérias foram captadas por minuto.

A correlação linear analisada nos tempos de 40 a 100 minutos mostrou que  $2,1 \cdot 10^3$  bactérias por minuto foram captadas na superfície do biosensor magnetoelástico. O coeficiente de correlação linear para este trecho foi de  $r^2 = 0,90$ . Essa diminuição da taxa de captação de bactérias indica que o sensor tende a saturar as ligações de anticorpos dispostas para as bactérias, a partir de 40 minutos de análise.

É notado que o coeficiente de correlação linear para ambos os casos se mostrou baixo, mesmo que realizadas em duas avaliações. Na totalidade da curva de concentração *versus* tempo, a característica é sigmoide, como mostrado por Guntupalli *et al.* (2007), entre outros.

Uma avaliação total da curva pode nos mostrar uma taxa de ligação mais apropriada e uma correlação maior. Entre os vários modelos Sigmoideais apresentados pelo software Origin 9.0, os comumente usados para curvas não-lineares são o *Sigmoidal Boltzmann* e *Sigmoidal logistic*, que caracterizam uma curva com ponto de inflexão. Até o ponto de inflexão a derivada segunda tem concavidade para cima, nula no ponto de inflexão e posteriormente concavidade para baixo, ou seja, derivada segunda negativa. O ponto de inflexão (EC50) mostra a taxa máxima de variação da função (FLORENTINO *et al.*, 2010). Para a interpretação das curvas de  $\Delta f$  apresentadas neste estudo, usamos o software Origin 9.0 com tratamento *Sigmoidal logistic*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com este tipo de análise podemos averiguar os posicionamentos percentuais (EC20, EC50, EC80) de taxas de ligações de bactérias para uma característica de curva não linear (GADAGKAR & CALL, 2014).

Os parâmetros fornecidos pela avaliação *Sigmoidal logistic* são o A1 (quantidade de bactérias inicial), A2 (quantidade de bactérias final),  $x_0$  (tempo relacionado ao ponto médio da inclinação),  $x$  (tempo) e  $p$  (potência de inclinação). A Figura 48 mostra a disposição das bactérias *versus* tempo com avaliação *Sigmoidal logistic* para análise do biosensor de superfície lisa.

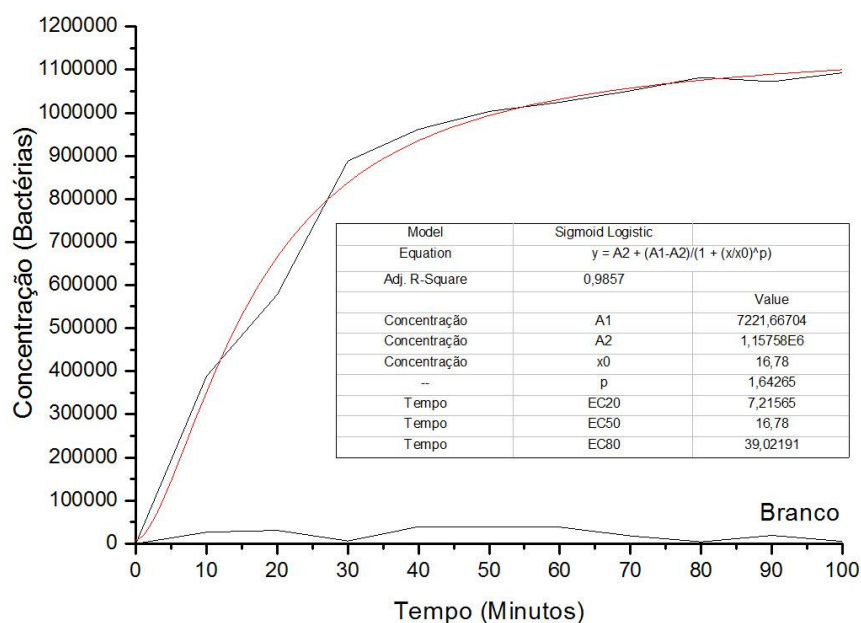


Figura 48. Avaliação *Sigmoidal Logistic* para as taxas de ligação entre *E. coli* e a superfície do biosensor magnetoelástico de superfície lisa (Origin 9.0).

O ponto EC50 (meio máximo de concentração efetiva) apresenta o tempo de 16,78 minutos e representa uma captação de  $5,58 \cdot 10^5$  bactérias na superfície do biosensor. A taxa de ligação de bactérias neste ponto é de  $3,46 \cdot 10^4$  bactérias por minuto. O EC20 mostra que 20% da quantidade de bactérias captadas pela superfície acontece em 7,21 minutos, correspondendo a uma captação de  $2,37 \cdot 10^5$  bactérias e uma taxa de ligação de  $3,29 \cdot 10^4$  bactérias por minuto. Outro ponto importante, o EC80, mostra que 80% das bactérias captadas pela superfície aconteceu em até 39 minutos de análise. Esse tempo de captação corresponde a  $9,26 \cdot 10^5$  bactérias captadas pela superfície do biosensor magnetoelástico e com taxa de ligação de  $2,37 \cdot 10^4$  bactérias por minuto.

A variação de leitura do biosensor branco, que é composto apenas por sensor com camadas de Cr e Au mais CYS e aplicado na mesma diluição de contaminação (não possui



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

anticorpos), mostrou valores médios de  $4,0 \pm 2,9$  Hz de  $\Delta f$  que corresponde em uma variação de  $2,1 \cdot 10^4 \pm 1,51 \cdot 10^4$  bactérias.

Entre EC50 e EC80, é notado uma redução de 31,5% na taxa de ligação das bactérias com a superfície do biosensor magnetoelástico. O coeficiente de correlação *Sigmoidal Logistic* apresenta um  $r^2 = 0,99$  e mostra que este tipo de avaliação poder ser usada para calcular quantas bactérias foram captadas pelo biosensor magnetoelástico, através das leituras de frequência de ressonância.

O sensor de superfície rugosa foi processado de mesma forma e a atuação em relação a montagem do biosensor e a aplicação das bactérias foi executada. Tabela 8 mostra os dados de  $\Delta f$  coletados e os desvios (S) de cada variação analisados em relação à amostra de sensor rugoso. A Figura 49 mostra as curvas de leituras de  $\Delta f$  para os 5 biosensores de superfície rugosa, juntamente com o sensor branco.

Tabela 8. Coleta de dados de  $\Delta f$  informando as variações dos 5 biosensores rugosos testados nas mesmas condições de montagem e contaminação.

Tempo (min)	$\Delta f$					Média $\Delta f$ (Hz)	S (Hz)
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5		
0	0	0	0	0	0	0	0
10	56	19	94	38	51	51,50	18,80
20	113	56	131	94	70	92,75	23,70
30	128	71	134	113	89	106,90	21,62
40	131	113	131	150	92	123,15	16,92
50	150	116	127	169	108	133,80	20,46
60	167	134	131	149	103	136,88	17,00
70	169	135	126	157	112	139,65	18,58
80	167	131	131	160	106	139,05	19,46
90	165	135	131	157	106	138,80	17,76
100	169	135	140	155	110	141,60	16,32



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

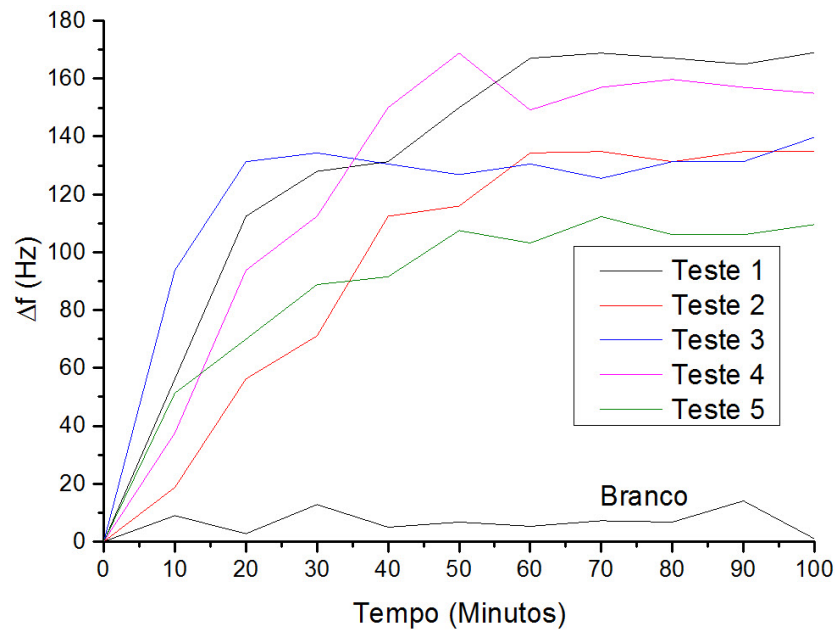


Figura 49. Curvas de  $\Delta f$  dos 5 biosensores de superfície rugosa, juntamente com o sensor branco (Origin 9.0)

Em comparação ao sensor liso testado anteriormente, observa-se grandes variações entre os biosensores de mesma composição e aplicação de bactérias. Os desvios apresentam altos valores não somente em tempos iniciais, mas nos tempos que englobam a saturação da superfície do biosensor. Isso indica que a topografia rugosa está relacionada com a falta de uniformidade das camadas que fazem parte da construção do biosensor e é ponto essencial de melhoramento. Outro fato apontado nesta avaliação são os baixos valores de  $\Delta f$  após os biosensores apresentarem a saturação. Comparando as capacidades de captação entre o biosensor liso e o rugoso, uma diferença aproximada de 60 Hz de  $\Delta f$  é verificada.

A Tabela 9 apresenta os valores de  $\Delta f$  convertidos em quantidade de bactérias captadas para os tempos de avaliação sugeridos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 9. Valores de  $\Delta f$  convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão rugosa de biosensor utilizado nos ensaios de detecção e quantificação.

Tempo (min)	Média $\Delta f$ (Hz)	S (Hz)	Concentração (bactérias)	S (bactérias)
0	0	0	0,0	0
10	51,50	18,80	2,8E+05	1,0E+05
20	92,75	23,70	5,0E+05	1,3E+05
30	106,90	21,62	5,8E+05	1,2E+05
40	123,15	16,92	6,6E+05	9,1E+04
50	133,80	20,46	7,2E+05	1,1E+05
60	136,88	17,00	7,4E+05	9,1E+04
70	139,65	18,58	7,5E+05	1,0E+05
80	139,05	19,46	7,5E+05	1,0E+05
90	138,80	17,76	7,5E+05	9,6E+04
100	141,60	16,32	7,6E+05	8,8E+04

Essa conversão aponta que  $7,6 \cdot 10^5$  bactérias foram captadas pela superfície do biosensor, mostrando uma captação inferior em comparação ao biosensor de superfície lisa testado anteriormente.

De mesma forma, a avaliação *Sigmoidal logistic* foi executada para o biosensor rugoso e a Figura 50 informa os resultados.

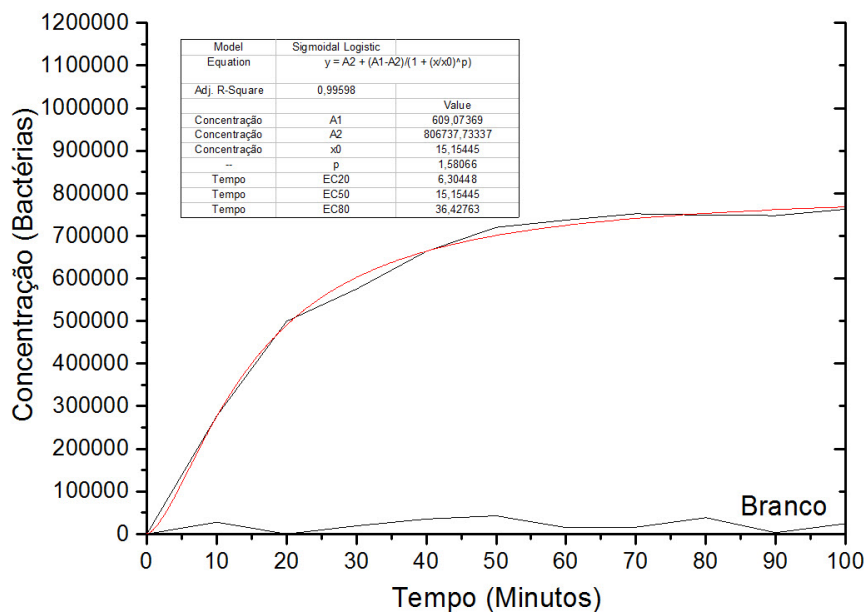


Figura 50. Avaliação *Sigmoidal Logistic* para as taxas de ligação entre *E. coli* e a superfície do biosensor magnetoelástico de superfície rugosa (Origin 9.0).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ponto EC50 apresenta o tempo de 15,15 minutos e representa uma captação de  $4,04 \cdot 10^5$  bactérias na superfície do biosensor. A taxa de ligação de bactérias neste ponto é de  $2,66 \cdot 10^4$  bactérias por minuto. O EC20 mostra que 20% da quantidade de bactérias captadas pela superfície acontece em 6,30 minutos, correspondendo a uma captação de  $1,61 \cdot 10^5$  bactérias e uma taxa de ligação de  $2,57 \cdot 10^4$  bactérias por minuto. O ponto EC80, mostra que 80% das bactérias captadas pela superfície aconteceu em até 36 minutos de análise. Esse tempo de captação corresponde a  $6,45 \cdot 10^5$  bactérias captadas pela superfície do biosensor magnetoelástico e com taxa de ligação de  $1,77 \cdot 10^4$  bactérias por minuto.

A variação de leitura do biosensor branco, que é composto apenas por sensor com camadas de Cr e Au mais CYS e aplicado na mesma diluição de contaminação (não possui anticorpos), mostrou valores médios de  $6,4 \pm 4,4$  Hz de  $\Delta f$  que representa uma variação de  $3,5 \cdot 10^4 \pm 2,38 \cdot 10^4$  bactérias.

Entre EC50 e EC80, é notado uma redução de 33,5% na taxa de ligação das bactérias com a superfície do biosensor magnetoelástico. O coeficiente de correlação *Sigmoidal Logistic* apresentou um  $r^2 = 0,99$ .

Na tentativa de melhoramentos nas captações de bactérias, o sensor polido foi testado da mesma forma que os anteriores. Tabela 10 informa os dados de  $\Delta f$  coletados e os desvios (S) de cada variação analisados em relação à amostra de sensor polido. A Figura 51 mostra as curvas de leituras de  $\Delta f$  para os 5 biosensores de superfície polida, juntamente com o sensor branco.

Tabela 10. Coleta de dados de  $\Delta f$  informando as variações dos 5 biosensores polidos testados nas mesmas condições de montagem e contaminação.

Tempo (min)	$\Delta f$					Média $\Delta f$ (Hz)	S (Hz)
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5		
0	0	0	0	0	0	0	0
10	38	56	38	44	56	46,20	8,04
20	94	92	105	75	113	95,55	10,46
30	206	181	161	206	220	194,75	18,80
40	231	210	217	200	214	214,35	7,92
50	230	206	220	214	223	218,50	6,80
60	233	227	229	214	224	225,05	5,24
70	231	224	229	208	226	223,50	6,20
80	226	228	229	201	223	221,30	8,12
90	229	228	226	208	226	223,40	6,16
100	231	228	230	213	227	225,70	4,98

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

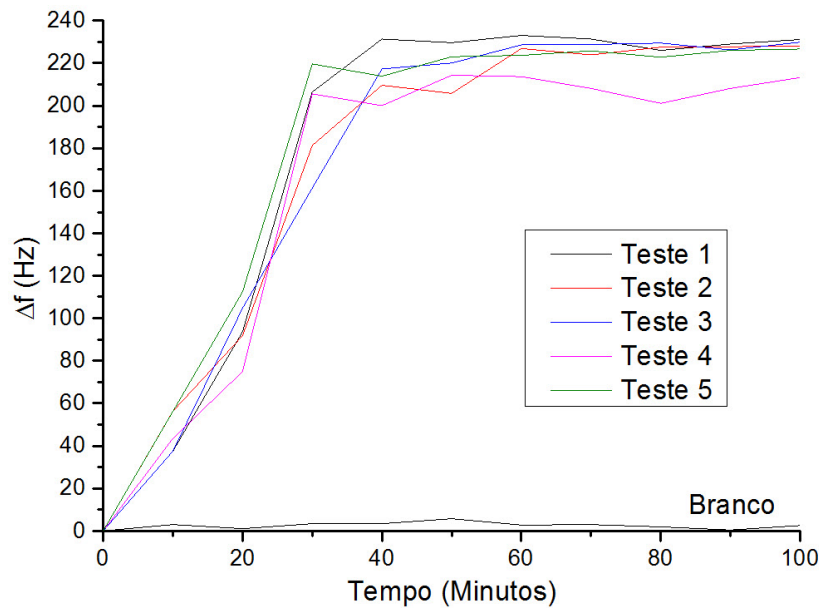


Figura 51. Curvas de  $\Delta f$  dos 5 biosensores de superfície polida, juntamente com o sensor branco (Origin 9.0).

Como verificado, ocorre uma redução efetiva nos valores de desvio padrão para os biosensores de superfície polida. Essa diminuição da variação de captação, em comparativo com os biosensores anteriores, mostra que o melhoramento proposto pelo polimento da superfície do sensor foi mantido após a deposição de Cr e Au e o posterior corte dimensional. Essa indicação nos direciona a investir mais tempo e trabalho no melhoramento da superfície dos biosensores, pelo simples fato de que, além de menores desvios, foi encontrado maiores valores de  $\Delta f$ , o que significa maior captação de bactérias na superfície polida do biosensor.

A Tabela 11 apresenta os valores de  $\Delta f$  convertidos em quantidade de bactérias captadas para os tempos de avaliação sugeridos, na avaliação do biosensor de superfície polida.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 11. Valores de  $\Delta f$  convertidos em unidades de bactérias captadas pela dimensão polida de biosensor utilizado nos ensaios de detecção e quantificação.

Tempo (min)	Média $\Delta f$ (Hz)	S (Hz)	Concentração (bactérias)	S (bactérias)
0	0	0	0	
10	46,20	8,04	2,5E+05	4,4E+04
20	95,55	10,46	5,2E+05	5,7E+04
30	194,75	18,80	1,1E+06	1,0E+05
40	214,35	7,92	1,2E+06	4,3E+04
50	218,50	6,80	1,2E+06	3,7E+04
60	225,05	5,24	1,2E+06	2,9E+04
70	223,50	6,20	1,2E+06	3,4E+04
80	221,30	8,12	1,2E+06	4,4E+04
90	223,40	6,16	1,2E+06	3,4E+04
100	225,70	4,98	1,2E+06	2,7E+04

Neste caso, é apontado uma captação de  $1,2 \cdot 10^6$  bactérias na avaliação dos biosensores de superfície polida. Em comparativo aos biosensores anteriores, fica evidenciado que o melhoramento proposto com o polimento, mais uma vez, é indicado para reduzir as variações entre os biosensores e a padronização destes.

Para verificar se a característica das curvas de captação de bactérias promovida pelos biosensores de superfície polida é mantida em comparação ao apresentado anteriormente, novamente usamos a avaliação *Sigmoidal logistic* para averiguar o comportamento do biosensor em questão, como mostrado na Figura 52.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

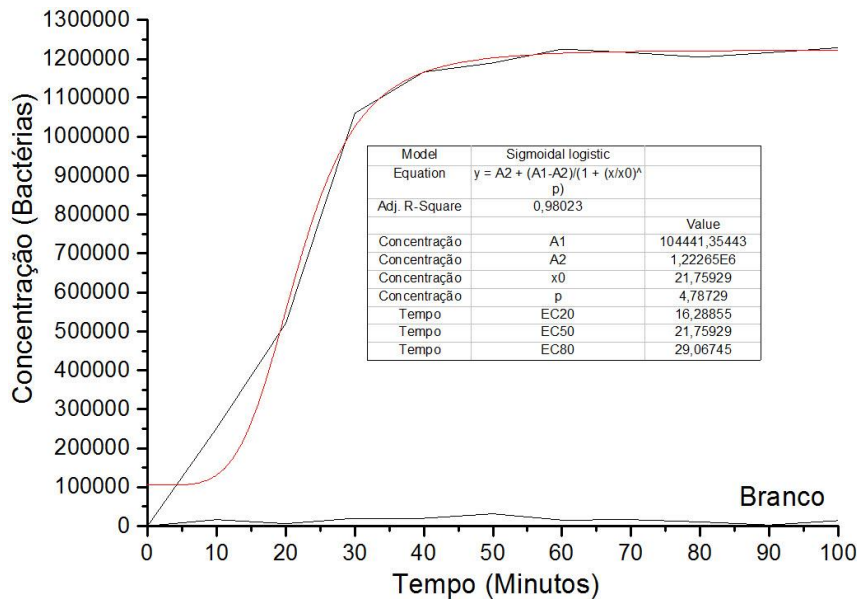


Figura 52. Avaliação *Sigmoidal Logistic* para as taxas de ligação entre *E. coli* e a superfície do biosensor magnetoelástico de superfície polida (Origin 9.0).

O ponto EC50 apresenta o tempo de 22 minutos e representa uma captação de  $7,23 \cdot 10^5$  bactérias na superfície do biosensor. A taxa de ligação de bactérias neste ponto é de  $3,08 \cdot 10^4$  bactérias por minuto. O EC20 mostra que 20% da quantidade de bactérias captadas pela superfície acontece em 16,30 minutos, correspondendo a uma captação de  $3,27 \cdot 10^5$  bactérias e uma taxa de ligação de  $2,01 \cdot 10^4$  bactérias por minuto. O ponto EC80, mostra que 80% das bactérias captadas pela superfície aconteceu em até 29 minutos de análise. Esse tempo de captação corresponde a  $9,98 \cdot 10^5$  bactérias captadas pela superfície do biosensor magnetoelástico e com taxa de ligação de  $3,44 \cdot 10^4$  bactérias por minuto.

A variação de leitura do biosensor branco, que é composto apenas por sensor com camadas de Cr e Au mais CYS e aplicado na mesma diluição de contaminação (não possui anticorpos), mostrou valores médios de  $2,5 \pm 1,6$  Hz de  $\Delta f$  que corresponde em uma variação de  $1,4 \cdot 10^4 \pm 8 \cdot 10^3$  bactérias, valor determinado pela média das leituras a cada 10 minutos.

Entre EC50 e EC80, é notado um aumento de 10,5% na taxa de ligação das bactérias com a superfície do biosensor magnetoelástico, o que indica que esse este tipo de sensor tem um potencial maior de captação de bactérias, em relação aos anteriores. O coeficiente de correlação *Sigmoidal logistic* apresentou um  $r^2 = 0,98$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS SUPERFÍCIES DOS BIOSENSORES CONTAMINADOS

A verificação da presença das bactérias sobre a superfície do biosensor foi feita por microscopia de fluorescência por método imunológico. Para analisar a presença de bactérias na superfície dos biosensores contaminados foi necessário adicionar novamente o anticorpo primário sobre o sensor por 1 hora, a temperatura ambiente e ao final o biosensor foi lavado por 3 vezes com PBS, pH 7,4. O anticorpo primário ligou-se somente nas bactérias *E. coli* que estavam na superfície do biosensor, que por sua vez estão ligadas ao mesmo anticorpo e a CYS no processo de atração de bactérias. A partir desse ponto, o anticorpo secundário foi adicionado para a ligação com o anticorpo primário, por 1 hora, a temperatura ambiente e ao final foi lavado 3 vezes com PBS, pH 7,4. O anticorpo secundário liga somente no anticorpo primário e não na bactéria. Como o anticorpo secundário está marcado com fluoresceína (Alexa Fluor 488), foi possível verificar a presença das bactérias que fizeram ligação com o anticorpo primário e secundário. O ensaio e microscopia é referenciado por Caravelli *et al.* (2013). A Figura 53 informa a sequência de ligação que envolve todos os processos da construção do biosensor magnetoelástico para a detecção e quantificação da *E. coli* até a detecção em fluorescência por método imunológico utilizados neste estudo.

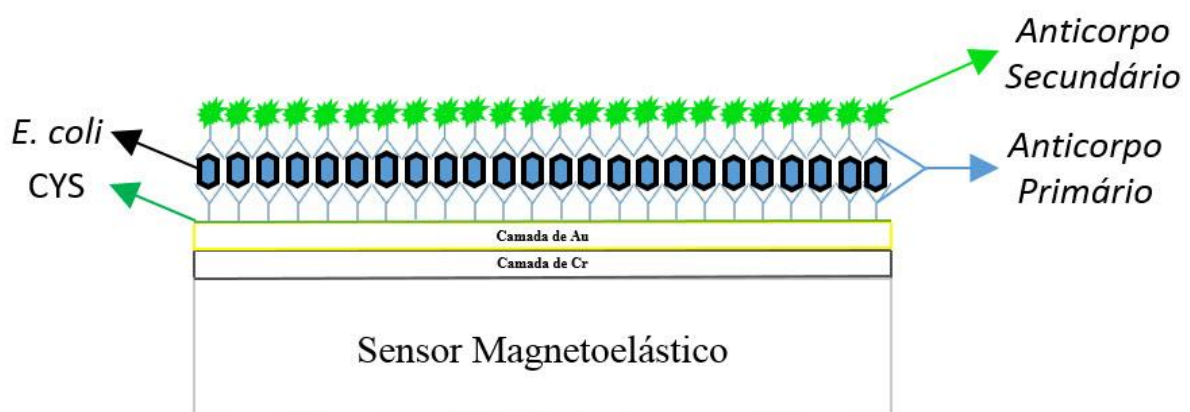


Figura 53. Sequência de camadas que envolvem a composição do biosensor, contaminação e a fluorescência (o autor).

As microscopias de fluorescência foram feitas para os três tipos de biosensores, usando o mesmo processo de construção que define cada peça e as mesmas diluições de bactérias anteriormente usadas.

A Figura 54 apresenta micrografias de um biosensor de superfície lisa. Em certas regiões do biosensor há maior concentração de bactérias, evidenciada pelas regiões



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

esverdeadas. As regiões mais escuras (fundo) indicam que não há bactérias ou a concentração está reduzida. A microscopia de fluorescência nos informa a presença de bactérias sobre o biosensor, mas não informa a uniformidade de dispersão de bactérias. As figuras a e b mostram regiões distintas do mesmo biosensor.

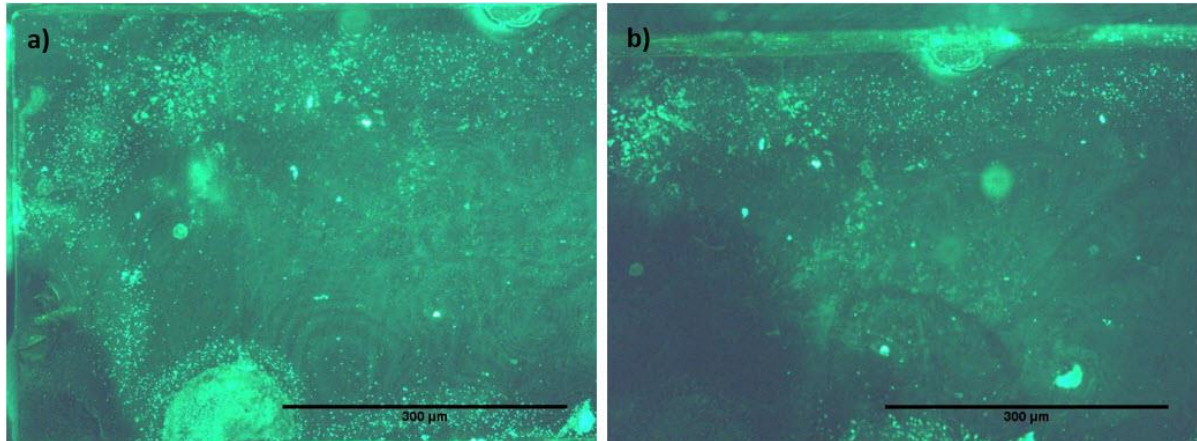


Figura 54. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície lisa em campos diferentes (LGPRD).

Na Figura 55 é evidenciado um aglomerado de bactérias. Com este aumento, a microscopia indica que o anticorpo pode estar ligado no antígeno LPS da bactéria *E. coli*, que se encontra na membrana celular das bactérias, como indicado por Gomes (2014). A região de maior fluorescência é evidenciada na membrana celular e o centro do bastonete apresenta menor intensidade de fluorescência.

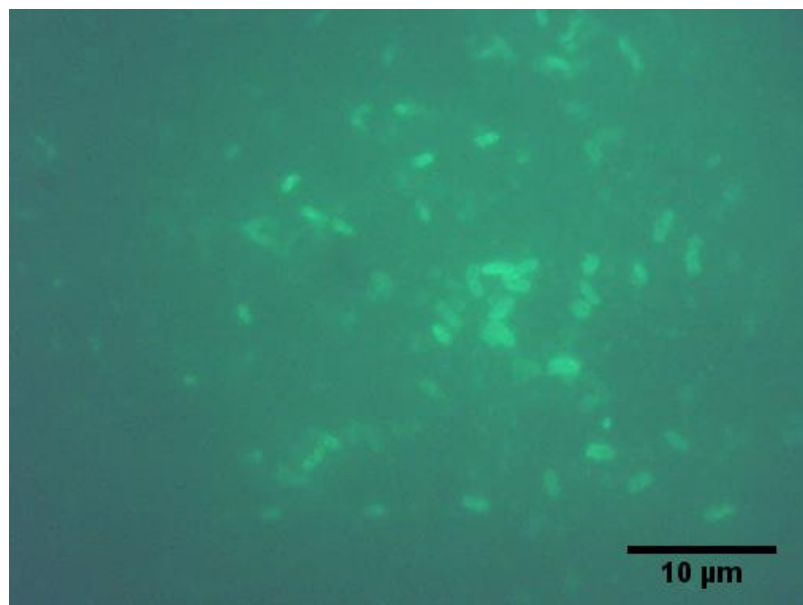


Figura 55. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície lisa (LGPRD).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Nas avaliações do biosensor de superfície rugosa foi verificado que a maioria das bactérias estava nas laterais do biosensor e também formando aglomerados. De fato, maiores quantidades de bactérias ficam alocadas nas sobras que estão nas laterais do biosensor. Várias regiões do biosensor apresentaram zonas de não captação que podem ser explicadas pelo relevo acidentado desta superfície, dificultado o posicionamento das camadas de CYS e anticorpos e facilitando a remoção das bactérias durante as lavagens com PBS pH 7,4, do processo de microscopia de fluorescência utilizado. A Figura 56 mostra a superfície do biosensor rugoso contaminado com *E. coli*.

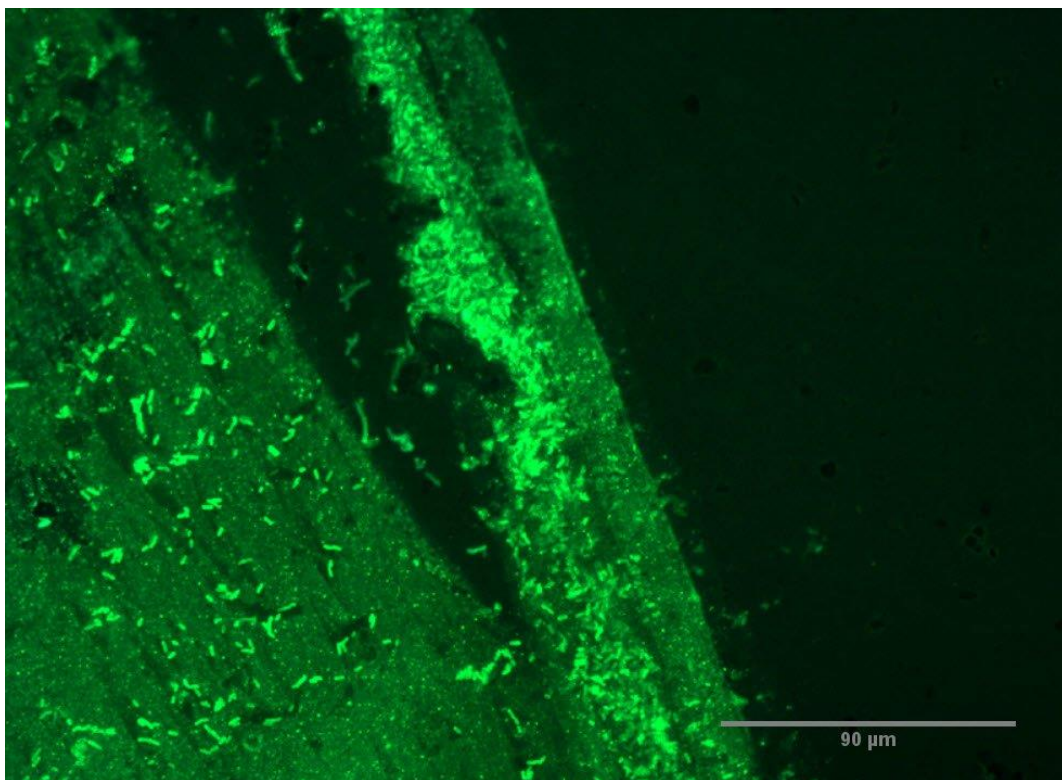


Figura 56. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície rugosa (LGPRD).

Seguindo a sequência de avaliação dos biosensores, o biosensor de superfície polida apresentou notáveis resultados de melhoria em termos de redução de desvio padrão e um aumento considerável em  $\Delta f$ , em comparativo aos outros biosensores.

De fato, as microscopias de fluorescência por método imunológico apresentaram resultados positivos, não somente apontando a presença de bactérias *E. coli* na superfície polida do biosensor, mas uma boa dispersão destas e com redução de espaços vazios, diferentemente das micrografias dos biosensores verificados anteriormente (Figura 57).

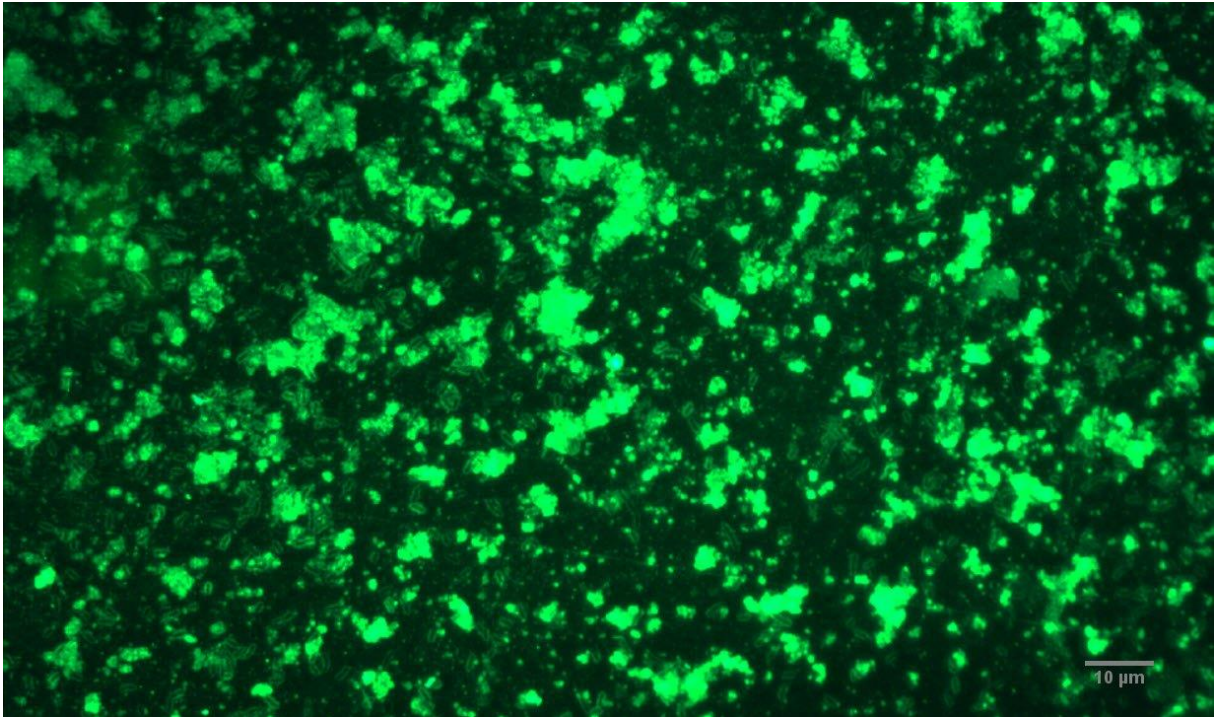


Figura 57. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície polida (LGPRD).

A Figura 58 indica que houve uma redução de espaço entre as bactérias *E. coli* na superfície do biosensor polido e, o que de fato indica que uma superfície polida, plana e menos acidentada pode ajudar em melhores acoplamentos compõe as camadas do biosensor, tanto para a CYS quanto para os anticorpos. As figuras a e b mostram regiões distintas do mesmo biosensor, com ampliação.

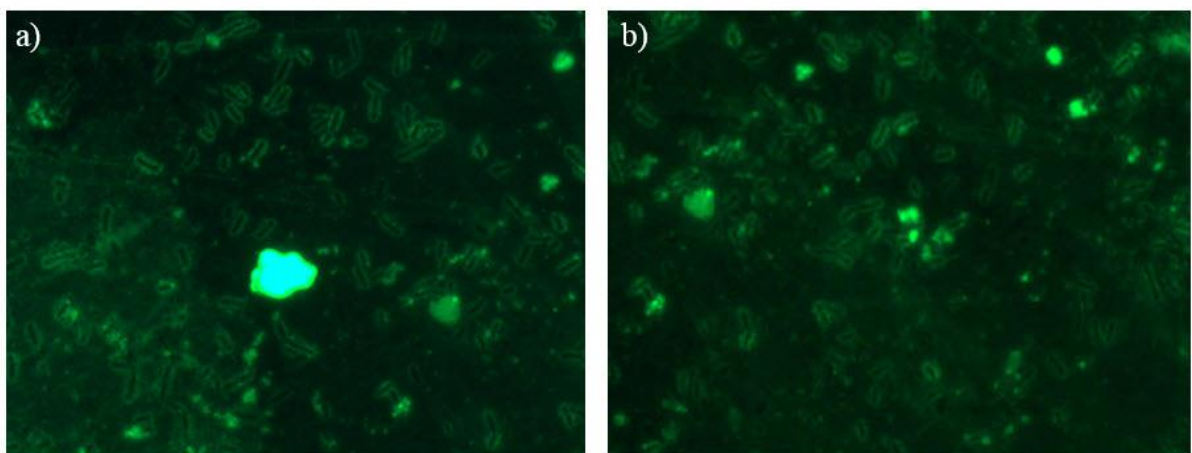


Figura 58. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície polida em campos diferentes (LGPRD).

Outra evidência de melhoramento foi encontrada neste tipo de biosensor de superfície polida. Este biosensor apresenta as laterais sem aglomerados de bactérias, como verificado

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

anteriormente nos modelos de biosensores liso e rugoso (Figura 59). A ausência de grandes aglomerados pode reduzir variações de leitura, juntamente com uma melhor dispersão das bactérias na superfície dos biosensores.

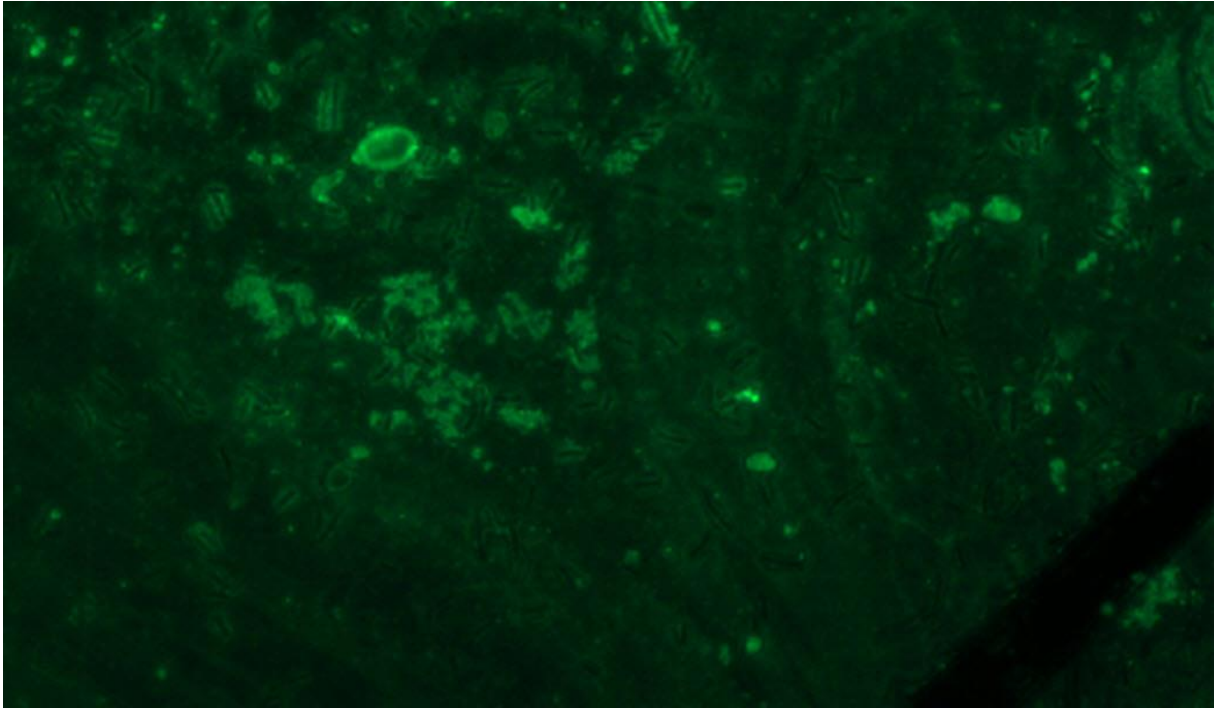


Figura 59. Microscopia de fluorescência do biosensor de superfície polida (LGPRD).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4 LIMITES DE DETECÇÃO

Para estimarmos os limites de detecção (LD) do método de análise apresentado anteriormente, usamos os valores médios das 10 leituras do biosensor controle (branco), que contempla os 100 minutos de análise para cada conjunto de biosensores utilizado. A Tabela 12 apresenta os valores para o LD de cada superfície testada.

Tabela 12. Limites de detecção em nanogramas em 1 mL, para as superfícies dos biosensores testados.

	<b>Liso</b>	<b>Rugoso</b>	<b>Polido</b>
<b>Média <math>-\Delta f</math> (Hz)</b>	4,0	6,4	2,5
<b>S <math>-\Delta f</math> (Hz)</b>	2,9	4,4	1,6
<b>Conversão (Bactérias em 1 mL)</b>	87071±63126	139313±95778	54419±34828
<b>Limite de Detecção (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	87±63	139±96	54±35

Conforme os valores mostrados nas estimativas, o biosensor de superfície polida apresentou o menor limites de detecção, seguido pelo biosensor de superfície lisa e rugosa. Desta forma, mais uma vez o sensor polido mostrou melhores resultados em comparativo as outras superfícies testadas, indicando que a sequência de produção dos biosensores deve seguir o planejamento sequencial de polimento da superfície da fita magnetoelástica, cobertura com Cr e Au e posterior corte dimensional.

## 6 CONCLUSÕES

A liga amorfa apresentou picos de ressonâncias de 450 KHz a 460 KHz, facilidade no dimensionamento por corte em serra *microdicing saw* e a aplicação de Cr e Au.

O corte proveu inúmeras peças de sensores magnetoelásticos e a camada de Au proporcionou uma boa aplicação de cistamina, com dispersão e compactação evidenciada em toda a superfície do sensor magnetoelástico.

O ponto de operação de leitura dos sensores magnetoelásticos foi verificado e os ajustes de leitura de frequência de ressonância mostraram melhor amplitude de 4 a 8V de DC bias para o sistema usado, compreendido pelo *pick-up coil* e o analisador de redes.

Verificou-se que os sensores magnetoelásticos, quando aplicados em meio líquido, sofrem amortecimento e redução do parâmetro *Q-factor*, em torno de 60% em relação ao ar.

A análise de FTIR indicou que a formação de SAM's de CYS entre 2 e 4 horas de aplicação sobre o sensor magnetoelástico são similares, contemplando a formação caótica em até 2h e melhor compactação em até 24h.

A microscopia eletrônica de varredura (FEG) mostrou que a CYS está presente sobre a superfície do sensor magnetoelástico com aglomerados menores que 250 nanômetros.

O polimento da fita amorfa seguido de deposição de Cr e Au e com posterior corte dimensional promoveu redução na variação dos resultados nas leituras de  $\Delta f$  e as micrografias de fluorescência por método imunológico atestaram melhoramento na dispersão de captação de bactérias e redução de aglomerados nas laterais do biosensor.

A análise da rugosidade apontou que o sensor polido possui menor média de rugosidade da superfície.

O método imunológico escolhido mostrou eficácia, ligando a bactéria sobre o anticorpo previamente ligado a SAM de CYS. O anticorpo detectou a bactéria *Escherichia coli O6 ATCC 25922*.

O biosensor de superfície polida apresentou o menor limite de detecção ( $54 \pm 35 \text{ ng mL}^{-1}$ ) indicando que a sequência de produção dos biosensores que contempla o polimento a superfície da liga magnetoelástica, cobrimento com Cr e Au e posterior corte dimensional, deve ser seguida.

As aplicações de suspensões contaminadas com *Escherichia coli O6 ATCC 25922* sobre o biosensor magnetoelástico mostraram diminuição na frequência de ressonância das leituras dos biosensores. Suspensões contaminantes mostraram características sigmóides, com



## **6 CONCLUSÕES**

---

início de aclave até 29 minutos para o biosensor de superfície polida e posterior estabilização, caracterizando ponto de saturação.

A partir dos dados obtidos observa-se que o método imunológico associado ao biosensor com melhoramentos na superfície, mostra-se como uma alternativa a ser considerada para a detecção e quantificação de microrganismos.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Implementação do sistema de fluxo para disponibilizar maior quantidade de bactérias sobre o biosensor e diminuir o espaço diametral da seção transversal dos *Eppendorf's*;
- Avaliação das superfícies por microscopia de força atômica (AFM);
- Teste de diferentes substâncias químicas para bioconjugados;
- Reproduzir procedimentos com outros tipos de patógenos.

## ANEXO I

Quadro 1 - Reagentes e vidrarias utilizados nos ensaios de crescimento de bactérias, limpeza de biosensores e análise e quantificação de bactérias por biosensores magnetoelásticos.

Reagentes	Sigla	Marca	CAS / ref.
1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide	EDC	Sigma	22572-40-3
Ácido Clorídrico 38%	HCl	Sigma	7647-01-0
Ágar Powder	-	HIMEDIA	RM026-500g
Albumina	BSA	Sigma	9048-46-8
Alumina 0,05 µm	-	Arotec	-
Álcool Etílico	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	Sigma	64-17-5
Bécker (50 mL e 250 mL)	-	-	-
Cistamina dicloro	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> .2HCl	Sigma	56-17-7
Cloreto de Potássio	KCl	Biosolve	7447-40-7
Cloreto de Sódio	NaCl	Sigma	7647-14-5
Eppendorf (250 µL, 600 µL, 1500 µL e 2000 µL)	-	-	-
Erlenmeyer (250 mL e 500 mL)	-	-	-
Fosfato de Potássio Monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Synth	F103.01.AG
Fosfato de Sódio Dibásico Heptahidratado	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Synth	F103.01.AH
Hidróxido de Potássio	KOH	Sigma	P5958
Leite em Pó	Molico	Nestlé	-
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	Sigma	67-56-1
Paraformaldeído	HO(CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> H	Sigma	30525-89-4
Peptone Bacteriological	-	HIMEDIA	RM001-500g
Placas de Petri (Ø 90mm)	-	-	-
Tryptone Type-1	-	HIMEDIA	RM014-500g



---

Fonte: o autor

Quadro 2 - Equipamentos utilizados na produção de biosensores e caracterização.

<b>Equipamentos</b>	<b>Marca</b>
Analizador de Redes E5061B	HP / Agilent
Autoclave Vertical	CS
Balança AY220 MAX 220g d=0,1mg	Shimadzu
Banho Ultrassônico	Genérico
FTIR Nicolet iS10	Thermo Scientific
Incubadora Shaker	Cienlab
MEV SSX - 550 Superscan	Shimadzu
Micropipetador 0,1:2 µL	Labmate
Micropipetador 100:1000 µL	Labmate
Micropipetador 2:20 µL	Labmate
Micropipetador 20:200 µL	Labmate
Microscópio de Imunofluorescência BX3/BX53	Olympus
Microscópio Metalográfico B100	Bioptika
Politriz Tegramin 20	Struers
Spectramax M2	Molecular Devices
Vórtex mod. 38266	Didática

Fonte: o autor

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKNA, J.; MIŠKINIS, R.; RUTKOWSKI, P.; URBA, E. Surface acoustic wave technology for poisson ratio sensors. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 64, n. 2, p. 133-136, 1998.

Appendix 9 - Sterilization Methods. In: BECKER, J. M.; CALDWELL, G. A., *et al* (Ed.). **Biotechnology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press p.210-211. 1996.

ARYA, S. K.; SOLANKI, P. R.; SINGH, R. P.; PANDEY, M. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Application of octadecanethiol self-assembled monolayer to cholesterol biosensor based on surface plasmon resonance technique. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 918-926, 2006.

ATEBA, C. N.; MBEWE, M. Determination of the genetic similarities of fingerprints from Escherichia coli O157:H7 isolated from different sources in the North West Province, South Africa using ISR, BOXAIR and REP-PCR analysis. **Microbiological Research**, v. 168, n. 7, p. 438-446, 2013.

BECKER, J. M.; CALDWELL, G. A.; ZACHGO, E. A. Exercise 1 - Aseptic Technique and Establishing Pure Cultures: The Streak Plate and Culture Transfer. In: BECKER, J. M.; CALDWELL, G. A., *et al* (Ed.). **Biotechnology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press p.9-16. 1996.

BIOCYCLOPEDIA. Handling and Examining Cultures. **Microbiology Methods**, Eplantscience, 2012. Disponível em: <[http://www.eplantscience.com/index/microbiology\\_methods/basic\\_techniques\\_biotechnologies/handling\\_examining\\_cultures.php](http://www.eplantscience.com/index/microbiology_methods/basic_techniques_biotechnologies/handling_examining_cultures.php)>. Acesso em: 1 de Agosto de 2014.

CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; MONTEMAYOR, C.; FATÁS, E.; PINGARRÓN, J. M. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 586, n. 1, p. 112-121, 2006.

CANCINO, J. C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alcanotíóis: uma abordagem sobre a transferência eletrônica**. 2008. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo: 2008, p. 2008.

CARAVELLI, A.; LUZ, D. E.; ANDRADE, F. B.; MORAES, C. T. P.; MARANHÃO, A. Q.; PIAZZA, R. M. F. Sensitive and specific detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli using recombinant anti-intimin antibody by immunofluorescence assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 4, p. 301-303, 2013.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

CARVALHAL, R. F. **Desenvolvimento de Sensor Biomimético Empregando Monocamadas Auto-Organizadas de Tióis sobre Eletrodos de Ouro**. 2005. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas: 2005, p. 2005.

CHING, F. D. K. E., JAMES F. **Bioquímica**. 4 ed. Artmed Editora, p. 1504, 2013.

CODOGNATO, L.; WINTER, E.; PASCHOAL, J. A. R.; SUFFREDINI, H. B.; CABRAL, M. F.; MACHADO, S. A. S.; RATH, S. Electrochemical behavior of dopamine at a 3,3'-dithiodipropionic acid self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 427-433, 2007.

CONTRIBUTORS, W. Preparação das Taq e Pfu DNA polimerases de Escherichia coli recombinante. Wikilivros, 7 de Março 2011. Disponível em: < [http://pt.wikibooks.org/w/index.php?title=Engenharia\\_gen%C3%A9tica/Prepara%C3%A7%C3%A3o\\_das\\_Taq\\_e\\_Pfu\\_DNA\\_polimerases\\_de\\_Escherichia\\_coli\\_recombinante&oldid=213121](http://pt.wikibooks.org/w/index.php?title=Engenharia_gen%C3%A9tica/Prepara%C3%A7%C3%A3o_das_Taq_e_Pfu_DNA_polimerases_de_Escherichia_coli_recombinante&oldid=213121) >. Acesso em: 29 julho de 2014.

CULLITY, B. D. **Introduction to Magnetic Materials**. Ed. 2. IEEE Press: John Wiley & Sons, p. 568., 2011.

EL-DEAB, M. S.; OHSAKA, T. Molecular-level design of binary self-assembled monolayers on polycrystalline gold electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 13, p. 2189-2194, 2004.

ERTL, P.; WAGNER, M.; CORTON, E.; MIKKELSEN, S. R. Rapid identification of viable Escherichia coli subspecies with an electrochemical screen-printed biosensor array. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 7, p. 907-916, 2003.

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.

FERREIRA, A. A. P.; FUGIVARA, C. S.; BARROZO, S.; SUEGAMA, P. H.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A. V. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 634, n. 2, p. 111-122, 2009.

FERREIRA, L. C. A defesa imunológica do corpo. Seu Sangue, 2013. Disponível em: < <http://seu-sangue.blogspot.com.br/2012/06/capitulo-4-defesa-imunologica-do-corpo.html> >. Acesso em: 25 de Agosto de 2014.

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. UNESP: Universidade Estadual Paulista. 28: 141 - 150 p. 2010.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, p. 381-389, 2003.

FREITAS, E. I. D.; LEMOS, A. A. D.; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, p. 1073-1083, 2006.

GOLDSTEIN, J. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis**. Ed. 3. Springer: Springer Science+Business Media, p. 690, 2003.

GOMES, M. **Gênero Escherichia spp.** LABACVET-UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 56, 2014.

GRIFFITHS, B. 6 - Surface Finish Specification. In: GRIFFITHS, B. (Ed.). **Engineering Drawing for Manufacture**. London: Butterworth-Heinemann p.111-133. 2003.

GRIMES, C. A.; ROY, S. C.; RANI, S.; CAI, Q. Theory, instrumentation and applications of magnetoelastic resonance sensors: a review. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 3, p. 2809-2844, 2011.

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

\_\_\_\_\_. Chapter 2 - The Chemistry of Reactive Groups. In: HERMANSON, G. T. (Ed.). **Bioconjugate Techniques (Second Edition)**. New York: Academic Press p.169-212. 2008b.

\_\_\_\_\_. **Chapter 3 - Zero-Length Crosslinkers**. New York: Academic Press, p. 213-233, 2008c.

HERZER, G. Magnetic materials for electronic article surveillance. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 254–255, n. 0, p. 598-602, 2003.

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: 25 de Agosto de 2014.

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

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

HOU, Z.; FINK, R. C.; SUGAWARA, M.; DIEZ-GONZALEZ, F.; SADOWSKY, M. J. Transcriptional and functional responses of *Escherichia coli* O157:H7 growing in the lettuce rhizoplane. **Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 136-142, 2013.

HRISTOFOROU, E.; KTENA, A. Magnetostriction and magnetostrictive materials for sensing applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 316, n. 2, p. 372-378, 2007.

HUANG, I. Y.; LEE, M. C. Development of a FPW allergy biosensor for human IgE detection by MEMS and cystamine-based SAM technologies. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 132, n. 1, p. 340-348, 2008.

HUANG, S.; HU, J.; WAN, J.; JOHNSON, M. L.; SHU, H.; CHIN, B. A. The effect of annealing and gold deposition on the performance of magnetoelastic biosensors. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 3, p. 380-386, 2008.

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.

KULICKE. Wafer Saw. **The Micro / Nano Fabrication Center**, Arizona Research Labs, 2014. Disponível em: < [http://mfc.engr.arizona.edu/Matrix/wafer\\_saw.htm](http://mfc.engr.arizona.edu/Matrix/wafer_saw.htm) >. Acesso em: 18 de Agosto de 2014.

LEE, J. Y.; SHIN, H. Y.; LEE, J. H.; SONG, Y. S.; KANG, S. W.; PARK, C.; KIM, J. B.; KIM, S. W. A novel enzyme-immobilization method for a biofuel cell. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 4, p. 274-278, 2009.

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.

LI, D.; FENG, Y.; ZHOU, L.; YE, Z.; WANG, J.; YING, Y.; RUAN, C.; WANG, R.; LI, Y. Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n. 1, p. 89-96, 2011.

LIANG, C.; MORSHED, S.; PROROK, B. C. Correction for longitudinal mode vibration in thin slender beams. **Applied Physics Letters**, v. 90, n. 22, p. -, 2007.

LIU, C.; HOFSTRA, N.; FRANZ, E. Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2-3, p. 119-128, 2013.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

LIVINGSTON, J. D. Magnetomechanical properties of amorphous metals. **physica status solidi (a)**, v. 70, n. 2, p. 591-596, 1982.

LOVE, J. C.; 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. 1103-1170, 2005.

LUEDTKE, B. E.; BONO, J. L.; BOSILEVAC, J. M. Evaluation of real time PCR assays for the detection and enumeration of enterohemorrhagic Escherichia coli directly from cattle feces. **Journal of Microbiological Methods**, v. 105, n. 0, p. 72-79, 2014.

MA, J.; MARK IBEKWE, A.; CROWLEY, D. E.; YANG, C.-H. Persistence of Escherichia coli O157 and non-O157 strains in agricultural soils. **Science of The Total Environment**, v. 490, n. 0, p. 822-829, 2014.

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: 25 de Agosto de 2014.

MCKENZIE, K.; MACLEAN, M.; TIMOSHKIN, I. V.; MACGREGOR, S. J.; ANDERSON, J. G. Enhanced inactivation of Escherichia coli and Listeria monocytogenes by exposure to 405nm light under sub-lethal temperature, salt and acid stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, n. 0, p. 91-98, 2014.

MENDES, R. K.; CARVALHAL, R. F.; KUBOTA, L. T. Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 612, n. 2, p. 164-172, 2008.

METGLAS. Metglas® 2826MB Magnetic Alloy. **Magnetic Materials**, Metglas Products, 2011. Disponível em: < [http://www.metglas.com/products/magnetic\\_materials/](http://www.metglas.com/products/magnetic_materials/) >. Acesso em: 7 de Agosto de 2014.

MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; DE CAMARGO, T. P.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Self-assembled monolayer of nickel(II) complex and thiol on gold electrode for the determination of catechin. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 1063-1068, 2009.

MOCCELINI, S. K.; VIEIRA, I. C.; DE LIMA, F.; LUCCA, B. G.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Determination of thiodicarb using a biosensor based on alfalfa sprout peroxidase immobilized in self-assembled monolayers. **Talanta**, v. 82, n. 1, p. 164-170, 2010.

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

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

MURRAY, R. P. Fisiologia e Estrutura. In: (Ed.). **Microbiologia médica**. 4 ed. Baltimore: Guanabara p.250 - 253. 2004.

OLAIMAT, A. N.; HOLLEY, R. A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 1-19, 2012.

PADRÃO, B. ELISA. Wordpress, 2010. Disponível em: < <http://biomedicinapadrao.wordpress.com/2010/05/05/elisa/> >. Acesso em: 31 de Julho de 2014.

PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W. Chapter Six - Escherichia coli. In: PERCIVAL, S. L.; YATES, M. V., *et al* (Ed.). **Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)**. London: Academic Press p.89-117. 2014.

PILLAY, J.; AGBOOLA, B. O.; OZOEMENA, K. I. Electrochemistry of 2-dimethylaminoethanethiol SAM on gold electrode: Interaction with SWCNT-poly(m-aminobenzene sulphonic acid), electric field-induced protonation–deprotonation, and surface pKa. **Electrochemistry Communications**, v. 11, n. 6, p. 1292-1296, 2009.

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.

ROSKAMS, J.; RODGERS, L. A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench. In: ROSKAMS, J. e RODGERS, L. (Ed.). **Lab Ref**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press p.19. 2002.

RUAN, C.; ZENG, K.; VARGHESE, O. K.; GRIMES, C. A. A staphylococcal enterotoxin B magnetoelastic immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 3, p. 585-591, 2004.

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.

SCHMIDT, S.; GRIMES, C. A. Characterization of nano-dimensional thin-film elastic moduli using magnetoelastic sensors. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 94, n. 3, p. 189-196, 2001.

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

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

SHARMA, A.; MATHARU, Z.; SUMANA, G.; SOLANKI, P. R.; KIM, C. G.; MALHOTRA, B. D. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1213-1218, 2010.

SHEN, W. **Detection of Biological Pathogens Using Multiple Wireless Magnetoelastic Biosensors**. 2011. (Tese de Doutorado). Auburn: 2011, p. 188. 2011.

SHEN, W.; LAKSHMANAN, R. S.; MATHISON, L. C.; PETRENKO, V. A.; CHIN, B. A. Phage coated magnetoelastic micro-biosensors for real-time detection of Bacillus anthracis spores. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 137, n. 2, p. 501-506, 2009.

SIU, L. Mass of a Bacterium. The Physics Factbook, 2003. Disponível em: <<http://hypertextbook.com/facts/2003/LouisSiu.shtml>>. Acesso em: 15 de Agosto de 2014.

SOWJANYA, M.; KISHEN KUMAR REDDY, T. Cooling wheel features and amorphous ribbon formation during planar flow melt spinning process. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 214, n. 9, p. 1861-1870, 2014.

SQUIRE, P. T. Phenomenological model for magnetization, magnetostriction and  $\Delta E$  effect in field-annealed amorphous ribbons. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 87, n. 3, p. 299-310, 1990.

STANFIELD, R. Determination of Antibody Structures. In: OSSIPOV, V. e FISCHER, N. (Ed.). **Monoclonal Antibodies**: Humana Press, v.1131 cap. 23, p.395-406. 2014.

TATINENI, S.; SARATH, G.; SEIFERS, D.; FRENCH, R. Immunodetection of Triticum mosaic virus by DAS- and DAC-ELISA using antibodies produced against coat protein expressed in Escherichia coli: Potential for high-throughput diagnostic methods. **Journal of Virological Methods**, v. 189, n. 1, p. 196-203, 2013.

TORMES, C. D.; BELTRAMI, M.; CRUZ, R. C. D.; MISSELL, F. P. Characterization of drying behavior of granular materials using magnetoelastic sensors. **NDT & E International**, v. 66, n. 0, p. 67-71, 2014.

TRABULSKI, R. L.; ALTHERTUM, F. In: (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Editora Atheneu p.271 – 307. 2008.

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

WANG, H.; GILL, C. O.; YANG, X. Development of a real-time PCR procedure for quantification of viable Escherichia coli in populations of E. coli exposed to lactic acid, and the



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

acid tolerance of verotoxigenic *E. coli* (VTEC) from cattle hides. **Food Control**, v. 43, n. 0, p. 104-109, 2014.

WEN, S.; LESLIE, C. M.; VALERY, A. P.; BRYAN, A. C. 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.

WILLIAMS, A. J.; GUPTA, V. K. Structure and formation of self-assembled monolayers of helical poly ( $\gamma$ -benzyl l-glutamate) by surface plasmon resonance and infrared spectroscopy. **Thin Solid Films**, v. 423, n. 2, p. 228-234, 2003.

WIRDE, M.; GELIUS, U.; NYHOLM, L. Self-Assembled Monolayers of Cystamine and Cysteamine on Gold Studied by XPS and Voltammetry. **Langmuir**, v. 15, n. 19, p. 6370-6378, 1999.

WISE, K. Spread Plate. Microbelibrary.org, 2006. Disponível em: < <http://lib.jiangnan.edu.cn/asm/087-Introduce1.htm> >. Acesso em: 1 de Agosto de 2014.

WU, Z. M.; HUANG, K.; LI, S. P.; KANG, J. Y.; ZHAO, Z. J.; YANG, X. L. Sensitivity enhancement of longitudinally driven giant magnetoimpedance magnetic sensor using magnetoelastic resonance. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 161, n. 1–2, p. 62-65, 2010.

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

YANG, L.; LI, Y. AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of *Escherichia coli* O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 7, p. 1407-1416, 2005.

ZHOU, Y.; WENG, Y.; ZHANG, L.; JING, F.; HUANG, N.; CHEN, J. Cystamine immobilization on TiO<sub>2</sub> film surfaces and the influence on inhibition of collagen-induced platelet activation. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 5, p. 1776-1783, 2011.