



XXIII SNPTEE
SEMINÁRIO NACIONAL
DE PRODUÇÃO E
TRANSMISSÃO DE
ENERGIA ELÉTRICA

FI/GIA/15
18 a 21 de Outubro de 2015
Foz do Iguaçu - PR

GRUPO-XI

GRUPO DE ESTUDO DE IMPACTOS AMBIENTAIS- GIA

IMUNOBIOSENSOR PARA RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO DE ÁGUA CONTAMINADA

Domingos M. C. Rodrigues (*) Vanessa M. Queiroz Rafaela N. Lopes Marcelo M. Werneck
Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF) – COPPE – UFRJ

Regina C. S. B. Alil
Centro Tecnológico do Exército – CTEx e LIF – COPPE – UFRJ

RESUMO

Este trabalho apresenta um imunobiosensor à fibra óptica para uma rápida detecção da bactéria. Foram testados sensores em forma de U, em espiral e zigzag. Na calibração utilizou-se soluções de sacarose para obter índices de refração (IR) de 1,33 a 1,39. Esta faixa equivale aos IR da água e da máxima concentração de bactérias, respectivamente. No transdutor, um LED ilumina uma extremidade da fibra e na outra um fotodetector captura o sinal. Este é processado por um microcontrolador. O sinal de saída varia de acordo com o IR e a respectiva concentração de bactérias da amostra, que é assim identificada.

PALAVRAS-CHAVE

Biosensor, Fibra óptica de plástico, Índice de refração, Bactéria, Microcontrolador

1.0 - INTRODUÇÃO

O combate contra as doenças está se tornando um desafio cada vez mais importante nos países em desenvolvimento, que devem contar com ensaios de diagnósticos facilmente disponíveis. Estes ensaios precisam ser de fácil operação e de resposta rápida, pois em muitos ambientes é importante ter a detecção imediata de contaminantes, seja para a qualidade da água, o diagnóstico clínico ou a segurança alimentar. Por outro lado, os métodos convencionais para a detecção de agentes patogênicos dependem de técnicas clássicas que envolvem a necessidade de pessoal e laboratórios especializados, além de serem métodos demorados, podendo chegar até 72 horas.

Durante as duas últimas décadas, surgiram um grande número de publicações na área das aplicações de sensores à fibras ópticas. Estes geralmente são utilizados para monitorar as concentrações em processos químicos ou biológicos. Normalmente, estes sensores exploram as alterações nas características de propagação de um feixe de luz dentro de uma fibra óptica, quando a amostra sob investigação interage com a fibra. A medição do índice de refração (IR) é necessária em um grande número de aplicações tanto em ambientes industriais quanto científicos [1].

Um crescimento significativo em tecnologias de biosensores vem substituindo métodos de detecção convencionais. Os biosensores dependem de um elemento de reconhecimento biológico que interage com o alvo e produz um sinal de saída que é usado pelo transdutor [2].

O princípio físico fundamental para o funcionamento dos sensores de fibras ópticas plásticas (POF-Plastic Optical Fiber) desenvolvidos é a interação do meio a ser medido com uma fibra curvada. A curva na fibra cria uma região sensível ao meio externo, provocando alterações na amplitude da luz guiada de acordo com o IR do meio externo em que a fibra estiver imersa.

LIF – Laboratório de Instrumentação e Fotônica

End: Av. Horácio Macedo, 2030, bloco I 2000, sala 036 –Subsolo - Centro de Tecnologia, Cidade Universitária – Rio de Janeiro – RJ. CEP: 21.941-598 - Tel: (+5521)3938-8200. Email: domingos@lif.coppe.ufrj.com.br

De acordo com um estudo anterior de nosso grupo [3], a sensibilidade e a incerteza das medições podem ser melhoradas através da alteração da forma da fibra. Este trabalho investiga os sensores com fibra em formas de U com dois raios diferentes, em forma de espiral e em forma de zigzag. Durante as experiências concentrações de sacarose de 15%, 25%, 30%, 45% e 52% produzem RI de 1,35, 1,36, 1,37, 1,38 e 1,39, respectivamente [4]. Estas soluções são utilizadas na calibração do sistema, que utiliza um microcontrolador Arduíno. Logo após, o sensor é testado para a detecção de concentrações diferentes da bactéria *Escherichia coli*.

2.0 - ASPÉCTOS TEÓRICOS

Nos guias de onda a luz é limitada dentro do núcleo pelo fenômeno da reflexão interna total (RIT). Assim, existe um ângulo crítico acima do qual todos os raios de luz sofrem RIT na interface núcleo/casca. Este ângulo é dada por:

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_{ca}}{n_{nu}} \right) \quad (1)$$

onde n_{ca} é o índice de refração da casca da fibra e n_{nu} é o índice de refração do núcleo.

Para ângulos de incidência próximos a θ_c alguns modos se propagam na interface entre o núcleo e a casca, gerando o conhecido campo evanescente. Em uma fibra dobrada as condições de propagação se alteram e alguns modos que se propagavam no núcleo da fibra se acoplam na casca e são perdidos. Na curva, alguns daqueles modos guiados pela casca, os de índice mais elevados, atingem a interface núcleo/casca com um ângulo menor do que θ_c , e assim parte da energia é perdida para a casca. No entanto, as lacunas vazias na casca oferecem espaço para novos modos que são recarregados provenientes do núcleo. Na interface da casca com a solução em que o sensor está imerso haverá outro ângulo crítico, assim todos os modos de casca que atingirem esta interface com ângulos maiores serão guiados. Alguns modos na curva atingirão a interface em ângulos menores do que o ângulo crítico e serão perdidos para a solução. Desta forma parte da energia óptica guiada pelo núcleo será perdida, não atingindo a outra extremidade da fibra e o IR da solução irá determinar a energia que será guiada pela fibra para o fotodetector na outra extremidade da fibra.

Uma análise já desenvolvida para uma fibra curvada [5], conforme mostra a Figura 1, determina a relação entre as potências de entrada e de saída como uma função do ângulo da curva, conforme descrito na Equação 2. Esta equação mostra que a potência de saída ($P(\phi)$) é proporcional ao ângulo de curvatura, de acordo com o estudo [6].

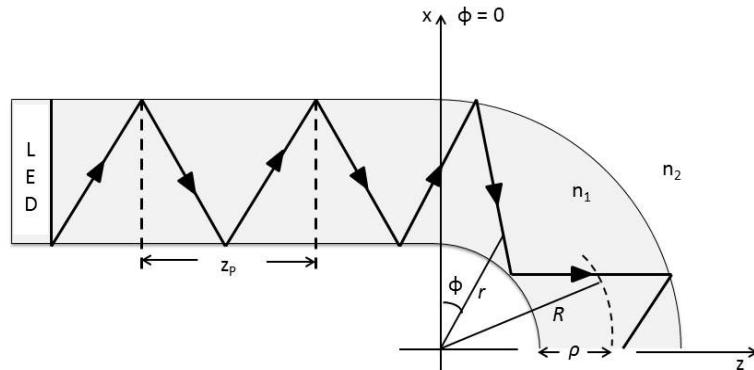


Figura 1 - Fibra em curva com variação do ângulo (ϕ). ρ – raio do núcleo; n_1 – índice de refração da fibra; n_2 – índice de refração do meio externo; R – raio da curva; r – distância entre o centro da curva e a luz guiada; z_p – distância de meio período entre sucessivas reflexões na fibra esticada

$$P_s(\phi) = P(0) \int_{R-\rho}^{R+\rho} dr \int_{-\theta_c(r)}^{\theta_c(r)} \exp(-\gamma\phi) d\theta \quad (2)$$

3.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Recursos e fabricação das quatro amostras

Considerando o exposto acima, os sensores desenvolvidos foram feitos em quatro formas diferentes, como mostra a Figura 2. As amostras foram inicialmente fabricadas pela fixação do sensor na forma desejada. Logo após a fibra é aquecida por um jato de ar quente e pressionada, permanecendo o sensor na forma ajustada após seu

refriamento. O sensor desenvolvido em forma de U menor, (Figura 2 - (a)) tem um raio interno de 3,5 mm. O sensor em forma de U maior (Figura 2-b) tem o dobro do raio do sensor em forma de U menor. O sensor em forma de espiral e zigzag estão representados na Figura 2-c e Figura 2-d, respectivamente.

Ambas as amostras foram feitas com POF multimodo (MM) convencional de telecomunicações de PMMA com núcleo de 1 mm de diâmetro, índice gradual da Mitsubishi Rayon Eska CK-40.

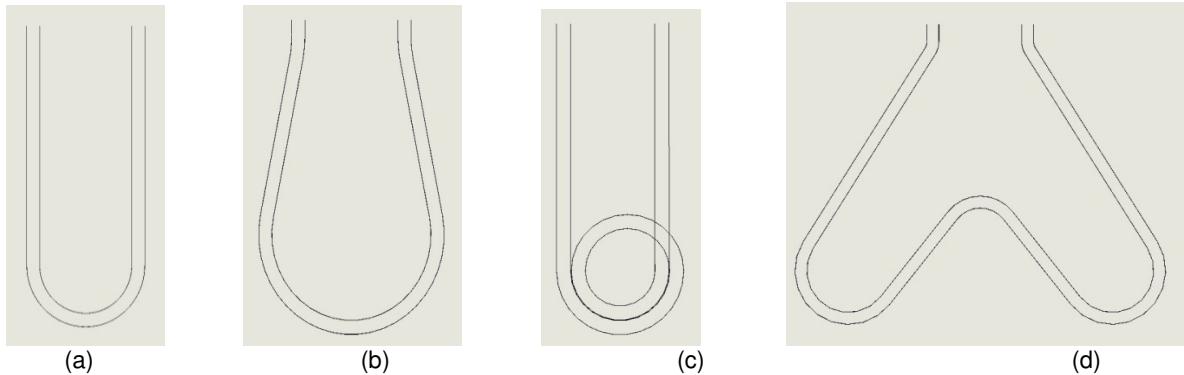


Figura 2 - Sensores desenvolvidos: (a) sensor U menor; (b) Sensor U maior; (c) Sensor espiral e (d) Sensor zigzag

3.2 A configuração eletrônica do sistema desenvolvido

Nas fibras dobradas alguns modos escapam, dependendo do índice de refração do meio. Neste caso, a concentração de sacarose e, mais tarde, devido à concentração de *Escherichia coli* em água. O sinal de tensão fotodetector varia de acordo com as alterações na concentração de sacarose ou a concentração de bactérias.

Na configuração desenvolvida, de acordo com a Figura 3, um LED é alimentado por uma fonte de corrente controlada por um microcontrolador Arduino. A configuração eletrônica mantém a corrente em 20 mA, proporcionando uma operação estável do LED. Deste modo, a luz recebida por um fotodetector diminui de acordo com o diferente IR do meio externo, ou de acordo com a quantidade de bactérias capturadas pelo anticorpo fixado no biosensor. A tensão de saída foi lida simultaneamente pelo microcontrolador Arduino (entrada A1) e por um Multímetro Digital de 6-1/2 dígitos - Tektronix DMM 4050.

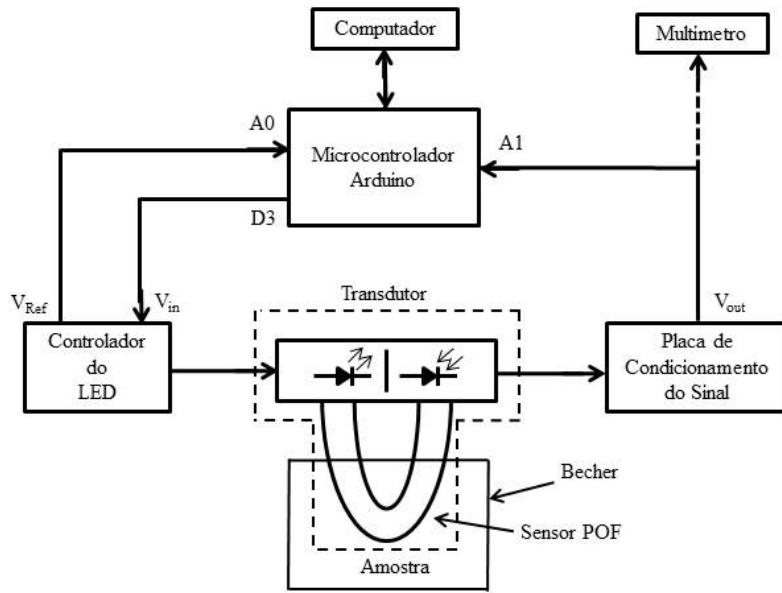


Figura 3 - Configuração eletrônica implementada para utilização dos sensores

Os sensores foram calibrados e sua sensibilidade, precisão e repetitividade foram avaliadas utilizando-se soluções de sacarose preparadas com água destilada estéril com concentrações de 15%, 25%, 30%, 45% e 52%. Estas concentrações produzem IR de 1,35, 1,36, 1,37, 1,38 e 1,39, respectivamente, medidas por um refratômetro Abbe comercial [7]. Durante o procedimento de calibração, cada sensor foi sequencialmente imerso nas soluções calibradas, e 10 conjuntos de medições foram registradas. Em seguida, os parâmetros de incerteza foram de

acordo com o ISO GUM 2008 (Guia para a Avaliação da Incerteza de Medição) [8]. A sensibilidade (S) é a primeira derivada da curva em relação ao IR, dada por :

$$S = \frac{\partial V_{out}}{\partial IR} \quad (3)$$

3.3 Protocolo de imobilização do anticorpo

O protocolo utilizado para a ligação de anticorpos foi adaptado de acordo com a metodologia proposta pela literatura [9]. Segmentos de fibra foram limpos com isopropanol (99%) durante 5 min, e depois completamente lavada com água destilada estéril.

As fibras foram incubadas numa solução de hexametilenodiamina a 10% preparada com 100 μ M de tampão borato pH 11,5 durante 2h à 30 °C. Depois de lavar duas vezes com água destilada, os fragmentos foram secos durante 2 horas a 37 °C. A fim de ativar a aminação, as fibras foram adicionados em uma solução de glutaraldeído a 2,5% preparado em tampão de fosfato pH 8,0, 0,1 M durante 2 h a 30 °C. Após este tratamento, as fibras foram lavadas vigorosamente três vezes com tampão de fosfato de pH 8,0, 0,1 M, seguido por secagem durante 2 horas a 37 °C.

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

A bactéria E. coli O55, utilizada na preparação das suspensões foi cultivada em agar de soja tríptica - TSA (MERCK, EUA) e incubou-se durante 24h a 37 °C. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram preparadas por adição de 10 μ L de TSA crescimento dos isolados clínicos de E. coli num tubo contendo 10 ml de água estéril. O tubo de vórtice foi agitado durante a homogeneização e inoculo em comparação com a turbidez da escala de McFarland 0,5 é equivalente a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias por millilitro (UFC/mL). Houve diluição de 1:10 da suspensão, obtendo-se assim concentrações de bactérias de 10^4 e 10^6 UFC/mL. Todo este processo é realizado em cerca de uma semana.

4.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amostras produzidas

Um dos objetivos deste estudo foi investigar diferentes arquiteturas de sensores POF, visando a uma maior sensibilidade, reprodutibilidade e precisão do biosensor. Assim, inicialmente, quatro amostras foram comparadas em relação à variação do índice de refração para identificar a sensibilidade e precisão. A Figura 4 compara as tensões de saída normalizada do sistema. É possível observar que o sensor em forma de U menor e zigzag apresentam maior sensibilidade, sendo respectivamente de 8,17 e 7,99. O sensor em forma espiral apresenta a pior sensibilidade de 6,41.

A Tabela 1 mostra o resultado geral das incertezas das medições realizadas com as amostras. Observa-se que não há diferença significativa entre as incertezas que são da ordem de 10^{-4} UIR. Considerando que a diferença entre água pura ($IR=1,33$) e bactéria pura ($IR=1,39$) é de 0,06 unidades de IR (UIR), nota-se facilmente que, com essa incerteza é possível diferenciar cerca de 600 diferentes e consecutivos IR ou seja, 600 diferentes concentrações bacterianas.

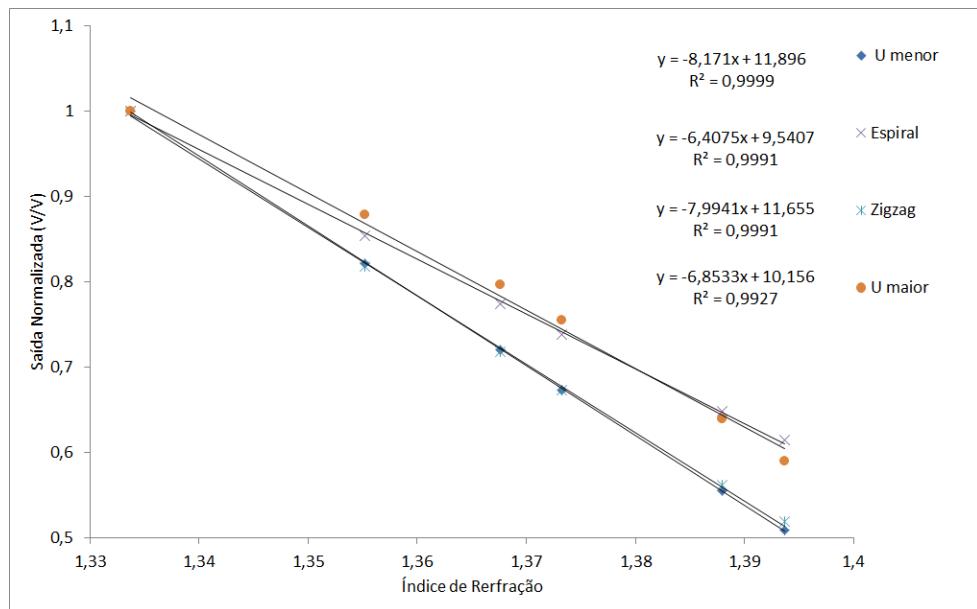


Figura 4 - Tensão de saída normalizada para os quatro sensores desenvolvidos quando imersos nas soluções de sacarose.

Tabela 1 - Incertezas das medidas realizadas com os quatro sensores desenvolvidos

IR	Incertezas			
	U menor	U maior	Espiral	Zigzag
1,3337	0,001	0,001	0,001	0,001
1,3552	0,0004	0,0004	0,0005	0,0004
1,3676	0,0003	0,0003	0,0004	0,0003
1,3733	0,0004	0,0003	0,0004	0,0003
1,3880	0,0004	0,0003	0,0004	0,0004
1,3937	0,0005	0,0004	0,0006	0,0004

Diferentemente de informações provenientes da literatura [3], não encontramos diferenças significativas entre as formas desenvolvidas, confirmando a eficiência e facilidade de fabricação do sensor em forma de U menor.

4.2 Biosensor

As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo descrito acima. As medições foram tomadas a cada cinco minutos, sendo as amostras descartadas após cada utilização. Antes das medições, os sensores permanecem imersos em água por cerca de uma semana, tempo este destinado à preparação do sensor com os anticorpos.

A Figura 5 compara os resultados obtidos com o sensor em forma de U menor e em forma de U maior. Observa-se que o sensor com raio maior apresentou uma maior variação entre as concentrações de 10^4 e 10^6 UFC/mL, o que permitirá a análise posterior das concentrações de 10^3 e 10^5 UFC/mL. As curvas superpostas são obtidas por regressão, apresentando coeficientes de regressão R^2 de 0,91 a 0,98. A razão das curvas de regressão é estudar a velocidade do efeito de imuno-captura das bactérias pelo filme de anticorpos. A derivada de cada curva de regressão em $t=0$ indica a velocidade de captura. Nota-se que a velocidade de captura aumenta com a concentração de bactérias na solução. O levantamento dessa velocidade vai facilitar a análise em experimentos futuros, pois não será necessário aguardar a saturação do filme de anticorpos com bactérias para se conhecer a concentração estudada, isso acarreta um tempo cerca de 30 minutos. Com a análise da velocidade podemos inferir a concentração da solução em análise em poucos minutos.

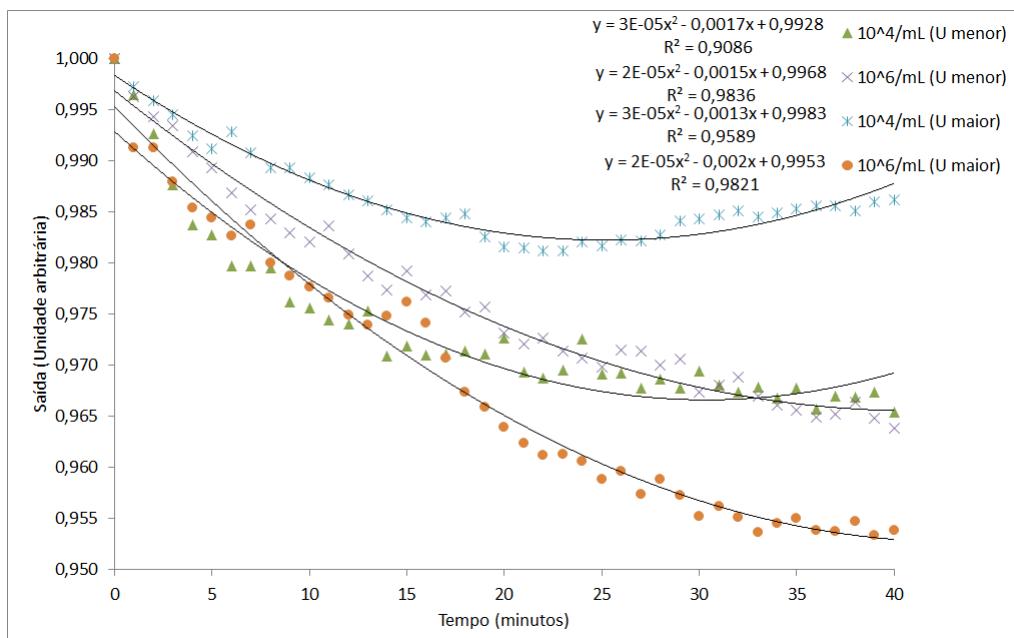


Figura 5 - Comparação entre os sensores em forma de U (maior e menor) analisando concentrações de bactérias com 10^4 e 10^6 UFC/mL.

5.0 - CONCLUSÕES

No presente trabalho os autores propõem a investigar diferentes formas de biosensores POF para detectar *Escherichia coli*. Este forneceu uma resposta rápida com precisão e sensibilidade adequada. A configuração implementada usando um microcontrolador Arduino apresentou eficiente, com uma boa resposta, facilidade na utilização e baixo custo.

O sensor em forma de U menor e Zigzag apresentaram melhores resultados para um mesmo sistema de detecção, com uma incerteza da ordem de 10^{-4} UIR. Entretanto a variação do raio apresentou melhores resultados no caso do biosensor, proporcionando uma leitura mais sensível das concentrações de bactérias de 10^4 e 10^6 UFC/mL, que permitirá no futuro a leitura de concentrações de 10^3 e 10^5 UFC/mL. Mais testes estão em andamento para melhorar a sensibilidade do sistema, tendo uma rápida detecção de água contaminada, mesmo em pequenos níveis de contaminação.

6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ZUBIA, J., GERMÁN G., ARRUE J., "Passive Device Based on Plastic Optical Fibers to Determine the Indices of Refraction of Liquids", *Applied Optics*, vol. 39, n. 6, pp. 941 – 946, 2000.
- (2) WANDERMUR G.L., RODRIGUES D. M. C., ALLIL, R. C. S. B., QUEIROZ V. M., PEIXOTO R., WERNECK M. M., MIGUEL M. "Plastic Optical Fiber-Based Biosensor Platform for Rapid Cell Detection". *Biosensors & Bioelectronics*, v. 54, p. 661- 666, 2013.
- (3) BERES, C., NAZARÉ, F. V. B., SOUZA N. C. C., MIGUEL, M. A. L. and WERNECK, M. M., "Tapered Plastic Optical Fiber-Based Biosensor", *Biosensors and Bioelectronics* 30, pp. 328 – 332, 2011.
- (4) FABIAN, M., LEWIS, E., NEWE, T., LOCHMANN, S. and MUELLER, I. Investigation of Ethanol And Methanol Water Mixtures in the Visible Wavelength Area Using Fibre-Optic Evanescent Field Absorption Sensors Based on a U-Shaped, a Coil-Shaped and a Meander-Shaped Probe. *SAS 2008 – IEEE Sensors Applications Symposium Atlanta, GA*, 2008.
- (5) SNYDER, W. A. and LOVE, J. D., "Optical Waveguide Theory", Chapman and Hall, New York, 1983.
- (6) GUPTA, B. D., DODEJA, H. e TOMAR, A. K. *Fibre-optic evanescent field absorption sensor based on a U-shaped probe*. *Optical and Quantum Electronics* 28 (1996) 1629-1639

- (7) RODRIGUES, D. M. C., "Desenvolvimento e caracterização de sensores a fibra óptica plástica para refratometria baseados em modulação de amplitude", Dissertação de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2013.
- (8) GUM – Evaluation of Measurement Data (2008) – www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html
- (9) FIXE, F., DUFVA, P., TELLEMAN, M., Christensen, C.B.V., 2004. Nucl. Acids Res. 32 (No. 1), 9.

7.0 - DADOS BIOGRÁFICOS



DOMINGOS MARCELUS CARIAS RODRIGUES nasceu no dia 19 de dezembro de 1975 em São Gonçalo-RJ. Graduado em Licenciatura e Bacharelado em Física pela Universidade Federal Fluminense em 2010 e Mestre em Engenharia Elétrica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2013, atualmente é aluno de Doutorado no Programa de Engenharia Elétrica da COPPE na Universidade Federal do Rio de Janeiro, com previsão de término em 2017. Integrante da Equipe de pesquisa do Laboratório de Instrumentação e Fotônica (LIF) da UFRJ, na área de sensores a fibra óptica, interagindo com a área de Microbiologia no estudo de sensores ópticos para detecção de bactérias.



MARCELO MARTINS WERNECK nasceu em Petrópolis, Rio de Janeiro, em 1949. Graduou-se em Engenharia Eletrônica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC) em 1975. Obteve seu MSc pelo Programa de Engenharia Biomédica da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em 1977 onde é professor adjunto desde 1978. Seu PhD foi obtido pela University of Sussex, no Reino Unido em 1985. Atualmente é coordenador do Laboratório de Instrumentação e Fotônica do Programa de Engenharia Elétrica e do Departamento de Eletrônica e Computação (Escola Politécnica e COPPE) onde desenvolve pesquisas na área de instrumentação e transdutores a fibra óptica



REGINA CELIA DA SILVA BARROS ALLIL nasceu no Rio de Janeiro/RJ. Ingressou para o Centro Tecnológico do Exército/CTEx no Laboratório de Optrônica e Sensores em 1985. Atualmente, está lotada na Divisão de Defesa Química, Biológica e Nuclear/Laboratório de Defesa Biológica, onde desenvolve pesquisa na área de instrumentação optoeletrônica e sensores a fibra óptica na identificação de agentes biológicos (biosensores). Tem experiência na área de Engenharia Biomédica, com ênfase em modelagem de fenômenos biológicos, atuando também em transdutores ópticos baseados em rede de Bragg (sensores de grandezas físico-químicas e iniciais) para os Setores Elétrico e de Óleo e Gás. Graduou-se em Engenharia Eletrônica pela Faculdade Professor Nuno Lisboa em 1988. Seu Latu Sensu foi realizado na COPPE/UFRJ em 1999. Obteve seu MSc pelo Programa de Engenharia Biomédica da COPPE/UFRJ em 2004, seu DSc no Programa de Engenharia Elétrica/Laboratório de Instrumentação e Fotônica da COPPE/UFRJ em 2010 e seu pós-doc no Programa de Engenharia Elétrica/Laboratório de Instrumentação e Fotônica da COPPE/UFRJ em 2014.



VANESSA DE MOURA QUEIROZ. Experiência em microbiologia e bioquímica em pesquisa, referência, prestação de serviços, indústria farmacêutica e alimentícia. Controle de Qualidade: Água de consumo e fabril, Sistema de osmose Reversa, Alimentos, Medicamentos e Matérias primas. Supervisão Laboratorial, Treinamentos. Garantia da Qualidade: Validação de Processos químicos e biológicos. Eficiência em Controle bacteriano cultivo, Técnicas de Identificação de Patógenos, Técnicas moleculares(RAPD, PCR e PFGE), ensaios imunológicos e bioquímicos de anticorpos em fibra ótica. Implementação laboratorial e aprimoramento de métodos, inovação em atividades de garantia da Qualidade. Acompanhamento em auditoria interna, não conformidades, Biossegurança em laboratório (principalmente reagentes químicos) junto a Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (CIPA).



RAFAELA NASCIMENTO LOPES nasceu em 15 de junho de 1985 em Barbacena, Minas Gerais. Graduou-se em Biomedicina pela Universidade de Uberaba em 2007. É especialista em Microbiologia e Parasitologia, com em laboratório de pesquisa, atuando principalmente em ensaios imunobiológicos, interação antígeno-anticorpo e técnicas de identificação de patógenos. É integrante de pesquisa do Laboratório de Instrumentação e Fotônica COPPE/UFRJ, onde desenvolve juntamente com o setor optoeletônico, pesquisas para o desenvolvimento de Biosensores, baseados em técnicas de imunocaptura, para a detecção de bactérias.