



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE
MATERIAIS**

Arnaldo César Dantas dos Santos Andrade

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO
ELETRÔNICO E SENSOR PLASMÔNICO PARA
DETECÇÃO DE GLICOSE**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria Albuquerque de Farias

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago Falcão

**Recife
2013**

Arnaldo César Dantas dos Santos Andrade

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO
ELETRÔNICO E SENSOR PLASMÔNICO PARA
DETECÇÃO DE GLICOSE**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Albuquerque de Farias

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência de Materiais como parte de requisitos
necessários à obtenção do diploma de Mestre em
Ciência de Materiais.

**Recife
2013**

Catálogo na fonte
Bibliotecário Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Andrade, Arnaldo César Dantas dos Santos.

Desenvolvimento de dispositivo eletrônico e sensor
plasmônico para detecção de glicose / Arnaldo César
Dantas dos Santos Andrade. – Recife: O Autor, 2013.
117 f.: fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Albuquerque de Farias.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais, 2013.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Nanotecnologia. 2. Eletrônica digital. I. Farias,
Patrícia Maria Albuquerque de (orientadora). II. Título.
620.5 (22. ed.) FQ 2014-27



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***ARNALDO CÉSAR DANTAS DOS SANTOS
ANDRADE***

**“DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO ELETRÔNICO E SENSOR PLASMÔNICO
PARA DETECÇÃO DE GLICOSE”**

A Banca Examinadora composta pelos Professores: PATRÍCIA MARIA ALBUQUERQUE DE FARIAS (ORIENTADORA E PRESIDENTE DA BANCA EXAMINADORA), do Departamento de Biofísica da UFPE; VALDIR LUNA DA SILVA, do Departamento de Bioquímica da UFPE; e JAILSON VIEIRA DE MELO, do Instituto de Química da UFRN; considera a Dissertação do candidato:

(X) APROVADA

() REPROVADA

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, em 24 de janeiro de 2014.

PROFA. PATRÍCIA MARIA ALBUQUERQUE DE FARIAS
PRESIDENTE E 1ª EXAMINADORA

PROF. VALDIR LUNA DA SILVA
2ª EXAMINADOR

PROF. JAILSON VIEIRA DE MELO
3º EXAMINADOR

Dedico a quem doou seu tempo, que me respeitou nas horas decisivas, me motivou a continuar e que fez dos momentos felizes inesquecíveis. Suzana, esta vitória é sua e de nossa filhinha Sara Susan.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Patricia Farias, pelo conhecimento e trabalho dedicados ao longo destes quase 13 anos de orientação e projetos acadêmicos, desde a minha graduação em Ciências Biológicas. Foi, de forma tão especial, a grande responsável por me estimular a ingressar em pesquisas avançadas em nanotecnologia.

Aos meus pais Arnaldo Lopes e Maria das Neves, pela entrega e dedicação incondicionais.

Aos meus irmãos, Alison Carlos, Cláudia Cristina, Bruno César e suas famílias adoráveis, grandes fontes de inspiração em tudo que faço.

Aos meus sogros João José e Railda Martins, sempre especiais.

Aos professores do programa em Ciência de Materiais, os quais foram fundamentais em formar as bases do meu conhecimento. Em especial ao meu co-orientador Eduardo Henrique Lago Falcão, pelos aconselhamentos e paciência.

A Thiago Seixas e Alexandre Nunes, ambos do núcleo de robótica da POLI/UPE, aos grandes companheiros de trabalho Josivandro Silva, Jamil Saade, Olavo Dhyan, Bruno Henrique e Maria Conceição pela força e companheirismo que me ofereceram durante este período.

Aos amigos Bruno Hashenburg, Gleydson Fonseca, Alexandre Marsal, Jorge Petribu, Daniela Petribu, Márcia Bastos, Rogério Bezerra e Hugo Cavalcanti pelo companheirismo e apoio.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Um dispositivo eletrônico para teste laboratorial remoto ou *point-of-care testing (POCT)* foi desenvolvido para detecção de glicose, sendo três as suas unidades estruturais: a fonte de luz, o sensor plasmônico e o transdutor de sinal. Após testes na primeira unidade estrutural do instrumento, optou-se por fonte de luz do tipo *laser* de ondas contínuas, trabalhando no comprimento de onda 780 nm. A segunda unidade estrutural é resultante de técnicas de engenharia molecular e síntese coloidal de um sensor plasmônico, estável, consumível em única dose. Funcionalizou-se a superfície dos nanobastões de ouro (NBAu), revestindo-os com polieletrólitos e em seguida conjugou-se com enzima glicose oxidase (GO) em camadas, pelo método *layer-by-layer (LBL)*. As camadas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis-NIR e obteve-se uma relação qualitativa entre estas e seus respectivos espectros de ressonância localizada de *plasmon* de superfície (*LSPR*). A *LSPR* possibilita uma ampla variedade de aplicações em dispositivos sensores baseados neste fenômeno. Os NBAu sintetizados neste trabalho apresentaram dois modos de absorção: (i) 550 nm o qual corresponde ao modo de oscilação transversal e (ii) 744 nm para o modo de oscilação longitudinal e sua morfologia foi obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi possível investigar a estabilidade de nanobastões funcionalizados com concentrações de poliestirenosulfonato de sódio (PSS). O sensor plasmônico NBAu-PSS-Poliacrilamida(PAM)-GO distinguiu absorções para soluções de concentrações distintas de glicose. Para a terceira unidade estrutural do instrumento foram selecionados transdutores de sinal e desenvolveu-se uma abordagem experimental que permitiu defini-los e programá-los a fim de reproduzir respostas correspondentes àquelas de analisadores convencionais. Um analisador de modulações *LSPR* foi programado no dispositivo eletrônico e ocorreu em conjunto com a síntese das nanoestruturas. A especificação do emissor de luz, a construção do sensor NBAu-PSS-PAM-GO e a definição do transdutor de sinal, permitiram elaborar uma instrumentação prática para a diagnóstico rápido. Este trabalho veio reforçar a importância da aplicação de nanoestruturas anisotrópicas para reconhecimento de macromoléculas. Uma estratégia semelhante foi contemplada neste mesmo dispositivo eletrônico, demonstrada em anticorpos conjugados aos nanobastões para reconhecimento da proteína troponina, como prova de conceito.

Palavras-chave: Sensor plasmônico. Nanossensor. *LSPR*. *POCT*

ABSTRACT

An electronic device point-of-care testing (POCT) was developed for the detection of glucose, three of its structural units: the light source, the plasmonic sensor and signal transducer. After testing the first structural unit of the instrument, it chose light source type *laser* continuous wave, working in the wavelength of 780 nm. The second structural unit is the result of molecular engineering techniques and synthesis colloidal of the plasmonic sensor, stable, consumable in a single dose. Overlaid to the surface of the gold nanorods (NBAu) by coating them with polyelectrolytes and then conjugated with glucose oxidase (GO) in layers, the method *layer-by-layer* (LBL). The layers were characterized by UV-Vis-NIR and obtained a qualitative relationship between these and the respective resonance spectra localized surface *plasmon* (LSPR). The LSPR enables a wide variety of applications in sensor devices based on this phenomenon. The NBAu synthesized in this work showed absorption two ways: (i) 550 nm which corresponds to the transverse oscillation mode and (ii) 744 nm for the longitudinal oscillation mode and the morphology was obtained by transmission electron microscopy (MET). It was possible to investigate the stability of nanorods functionalized with concentrations of poly(sodium4-styrenesulfonate)(PSS). The plasmonic sensor NBAu-PSS-polyacrylamide (PAM)-GO distinguished absorptions solutions for different concentrations of glucose. For the third structural unit of the instrument were selected signal transducers and developed an experimental approach that allowed them to define and schedule them to reproduce responses corresponding to those of conventional analyzers. A LSPR modulation analyzer was programmed into the electronic device and occurred in conjunction with the synthesis of nanostructures. The specification of emitting light, the sensor construction NBAu-PSS-PAM-GO and the definition of signal transducer, allowed to elaborate a practical instrument for the rapid diagnosis. This study reinforces the importance of the application of anisotropic nanostructures for recognition of macromolecules. A similar strategy was contemplated in the same electronic device, shown in nanorods conjugated to antibodies to recognize the protein troponin , as proof of concept.

Keywords: Plasmonic sensor. Nanosensor. LSPR. POCT

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características de nanoestruturas plasmônicas. (UIR:Unidade de Índice de Refração). Adaptada de TAERIN <i>et al</i> (2011).....	24
Tabela 2- Classificação internacional das enzimas (FERNANDES, 2005).....	28
Tabela 3- Tipos de <i>Lasers</i> , comprimentos de onda em que operam e tipo da potência de saída. Adaptada de BURTS <i>et al</i> (2008).....	36
Tabela 4- Faixa da razão de aspecto (C=comprimento/ L=largura) dos NBAu e seu percentual de frequência nas faixas identificados nas imagens de MET.....	56
Tabela 5- Concentrações padrão de glicose e intervalos de confiança obtidos a partir de três repetições de cada variável dos equipamentos, aqui apresentadas com seus valores médios (n=6).....	29
Tabela 6- Sinal ADC de NBAu recobertos por diferentes concentrações de PSS. As fontes de luz são diodo emissor a 850 nm e diodo <i>laser</i> a 650 nm.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
A/D	Analógico/digital
ADC	Conversor analógico-digital
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
CW	<i>Continuous wavelength</i>
EC	Enzyme Commission
EPM	Erro padrão médio
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídio
FET	<i>Field effect transistor</i>
GO	Glicose Oxidase
GUI	<i>Graphic user interface</i>
IHM	Interface homem-máquina
LBL	<i>layer-by-layer</i>
LCD	<i>Liquid crystal display</i>
LED	<i>Light emitting diode</i>
LoD	<i>Limite de detecção</i>
LoQ	<i>Limite de quantificação</i>
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NBAu	Nanobastões de ouro
PAM	Poliacrilamida
PMT	<i>Fotomultiplicador</i>
POCT	<i>Point-of-care testing</i>
PSOC	Programmable system-on-chip
PSS	Poliestirenosulfonato de sódio
ROM	<i>Read-only memory</i>
SAR	Reflectometria angular de varredura
SMD	<i>Surface Mount Device</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
UIR	Unidade de Índice de Refração
USB	<i>Universal serial bus</i>
UV-Vis-NIR	Ultravioleta-Visível-Infravermelho Próximo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Configuração de KRETSCHMANN. Adaptada de VAN GENT <i>et al</i> (1990).....	20
Figura 2- <i>LSPR</i> produzida pela interação entre os elétrons livres de esferas metálicas e uma onda eletromagnética incidente. Adaptada de KELLY (2003).....	21
Figura 3- Absorbância do NBAu. Adaptada de LINK; EL-SAYED (1999).....	22
Figura 4- Espectro eletromagnético com limites de <i>plasmon</i> em várias morfologias de nanopartículas. Adaptada de LAL <i>et al</i> (2007).....	23
Figura 5- Precipitação de nanobastões de ouro.....	25
Figura 6- Estrutura da unidade monomérica do PSS.....	26
Figura 7- Estrutura da unidade monomérica da PAM.....	26
Figura 8- Estrutura de um aminoácido (a) e de uma ligação peptídica (b) (MOTTA,1901)....	28
Figura 9- Níveis de organização de uma proteína (NELSON, COX, 2002).....	28
Figura 10- Simulações computacionais da enzima glicose oxidase (SANTOS, 2012) (a) e da relação carboidrato, enzima-cofator representados no modelo de fitas para estruturas moleculares (b) (VIEIRA, 2006).....	30
Figura 11- Aspecto da solução enzimática a 300mg/dL de GO.....	31
Figura 12- A GO oxida a molécula de glicose. Adaptada de WITT <i>et al</i> (2000).....	31
Figura 13- As linhas horizontais reproduzem estados eletrônicos, sendo: S0, S1 e S2 os estados eletrônicos fundamentais. Já as linhas intermediárias reproduzem estados eletrônicos vibracionais. As transições eletrônicas seguem na direção das linhas verticais e no lado direito da figura percebe-se que há uma correlação das transições com espectros de absorção. Os estados rotacionais não foram representados. Adaptada de ROSA (2013).....	34
Figura 14- Representação esquemática de um laser semiconductor. Adaptada de FERREIRA (2003).....	38
Figura 15- Curva de potência de um diodo <i>laser</i> . T_j =temperatura na junção. Adaptada de MALZAHN (2004).....	38
Figura 16- Processamento digital de sinais analógico. $X_c(t)$ = sinal contínuo original, n = variável do tempo discreto, $X[n]$ = sinal discreto, $Y[n]$ = sinal processado e $Y_c(t)$ = sinal contínuo reconstruído. Adaptada de NALON (2009).....	43

Figura 17- Diagrama de blocos: 1- Sensor plasmônico ; 2- Sensibilização do fototransistor (transdutor extrínseco) pelo feixe de luz resultante da interação do feixe de luz incidente na amostra; 3- Elementos do sistema de aquisição de dados.....	44
Figura 18- Componentes do <i>POCT</i> . O item 1 representa a fonte de luz; o item 2 representa a célula de absorção, a qual mantém a amostra líquida na trajetória de um feixe de luz; o item 3 é o fototransistor como transdutor extrínseco. O sinal elétrico está representado no item 4....	52
Figura 19- Estrutura em camadas do <i>POCT</i>	53
Figura 20- Diagrama esquemático apresentando os subsistemas do primeiro nível (LCD, <i>Flash</i> , <i>Touch</i>) interligados com os subsistemas do segundo nível (Processador e Sistema programável no chip – PSOC). Os protocolos de comunicação estão evidenciados em cada conexão entre subsistemas.....	54
Figura 21- Apresentação da morfologia (a esquerda) em formato de bastão, a partir de imagem MET. A direita, o histograma da distribuição de frequência da razão de aspecto e resultados extraídos da Tabela 4.....	57
Figura 22- Etapas de síntese. Adaptada de ZHANFANG E DING (2009).....	57
Figura 23- Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu e NBAu funcionalizado com PSS a 0,2mL.....	58
Figura 24- Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu funcionalizado com PSS a 0,1mL e 0,2mL.....	58
Figura 25- Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu-PSS a 0,2mL (curva verde) NBAu-PSS-PAM (curva preta); NBAu-PSS-PAM-GO (curva vermelha) e reconhecimento da Glicose pelo sensor (curva azul).....	59
Figura 26- Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu/PSS/PAM/GO em presença de concentrações diferentes de glicose (mg/dL). A direita, as curvas correspondentes a 50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL estão destacadas.....	60
Figura 27- Relação entre as concentrações padrão de glicose (50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL) e absorção (u.a.) do espectrofotômetro HR 4000.....	62
Figura 28- Relação entre as concentrações padrão de glicose (50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL) e sinal digital ADC do <i>POCT</i>	62
Figura 29- Relação entre as concentrações padrão de glicose (50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL) e resposta do glicosímetro Accu-Chek® Active.....	63
Figura 30- Relação entre a resposta do glicosímetro Accu-Chek® Active vs. sinal ADC do dispositivo eletrônico <i>POCT</i>	64

Figura 31- Relação entre sinal ADC do dispositivo eletrônico <i>POCT</i> vs. Absorção (u.a) do HR 4000 da Ocean Optics.....	64
Figura 32- <i>Programmable system-on-chip</i> (PSOC). No detalhe A-chip central e B-display de cristal líquido.....	65
Figura 33- PSOC ligado ao protótipo do sistema de leitura montado sobre a <i>protoboard</i> (detalhe C). A direita é apresentado o diagrama de circuito do POCT para o sistema emissor-receptor.....	66
Figura 34- Display de cristal líquido do PSOC registra em sua primeira linha, o sinal ADC e em sua segunda linha, seu respectivo sinal de tensão elétrica.....	67
Figura 35- Medidas de absorção com a cubeta vazia. O ângulo da imagem A permite observar o sinal oriundo do LED azul. A imagem B apresenta uma visão panorâmica do caminho óptico.....	67
Figura 36- Display do PSOC registra ADC com cubeta vazia na imagem C, o sinal ADC da imagem D representa cubeta com água.....	67
Figura 37- Primeira versão (V1) do instrumento <i>POCT</i> . No centro o sistema montado na caixa. A esquerda temos o circuito emissor-receptor. A direita um detalhe do porta-cubeta.....	68
Figura 38- POCTV2: Segunda versão (V2) do instrumento <i>POCT</i> . No centro pode-se perceber um novo sistema com porta-cubeta com orifício de passagem para o feixe <i>laser</i> , em nylon. A esquerda a nova fonte de luz com diodo <i>laser</i> . A direita um detalhe do diodo <i>SMD(fototransistor)</i>	69
Figura 39- Circuito eletrônico do fototransistor, apresenta um amplificador operacional e controle de saturação da corrente I_c	70
Figura 40- O design do POCTV2 traz uma armação em PVC (no detalhe A do lado esquerdo). Internamente um circuito com o chip programável em PSOC e um display (lado direito da Figura).....	70
Figura 41- No detalhe ao centro observa-se o chip, o qual já programado, conecta-se na placa do POCTV2.....	70
Figura 42- Componentes internos do POCTV3. No detalhe A temos o sistema de refrigeração metálico, em B o controlador da tela <i>touchscreen</i> (detalhe C2) e em C o sistema montado com a célula de Peltier (detalhe C1) conectada ao circuito.....	71
Figura 43- Aproximação gráfica do par coordenado de uma extremidade a outra da linha vermelha, desde a corrente de 3 mA até tensão de 3,3 V.....	72
Figura 44- Curvas obtidas da relação sinal digital ADC vs. tempo (s). Na curva A foi testado o volume de 1 mL do sensor plasmônico e na curva B, 2 mL.....	73

Figura 45- Curvas de relação sinal digital ADC vs. tempo (s) para volumes de controle diferentes, 1mL (curva verde), 2 mL (curva roxa) e um teste de sensor plasmônico em presença do analito a 2 mL (curva azul).....73

Figura 46- Tela típica do POCTV3 selecionado no módulo de analisador cinético.....74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. PLASMÔNICA	19
1.1.1 Ressonância localizada de <i>plasmon</i> de superfície	20
1.2 NANOESTRUTURAS METÁLICAS	23
1.2.1 Estabilidade de nanoestruturas	24
1.2.2 Estabilizantes, polieletrólitos e funcionalização	25
1.2.2.1. Poliestireno sulfonato de sódio (PSS)	26
1.2.2.2. Poliacrilamida (PAM)	26
1.3 ENZIMAS	27
1.3.1 Glicose oxidase	30
1.4 TÉCNICA <i>LAYER-BY-LAYER</i>	32
1.5 FOTOMETRIA	32
1.5.1 Fotômetro e seus componentes	35
1.5.1.1 Fonte de luz	35
1.5.1.1.1 <i>Laser</i>	35
1.5.1.1.2 <i>Laser semiconductor</i>	37
1.5.1.1.3 <i>Diodo emissor de luz</i>	39
1.5.1.1.4 <i>Lâmpada de Tungstênio</i>	39
1.5.1.2 Cubeta	39
1.5.1.3 Transdutor	40
1.5.1.3.1 <i>Sensores e suas tecnologias</i>	41
1.5.1.3.2 <i>Fototransdutores</i>	41
1.5.1.3.2.1 Fotodiodo de semiconductor	42

1.5.1.3.2.2 Fototransistor	42
1.5.1.3.3 Sinal elétrico	43
1.5.1.3.4 Dispositivo de leitura	44
1.6 MEDIDAS DE PERFORMANCE	45
1.6.1 Faixa	45
1.6.2 Resolução	45
1.6.3 Sensibilidade	45
1.6.4 Exatidão	46
1.6.5 Precisão	46
2. OBJETIVOS	47
2.1. OBJETIVO GERAL	47
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. SÍNTESE DO SENSOR PLASMÔNICO	48
3.1.1 Reagentes e equipamentos utilizados	48
3.1.2 Métodos	48
3.1.2.1. Síntese do colóide semente de ouro	48
3.1.2.2. Síntese de nanobastões de ouro	49
3.1.2.3. Funcionalização dos nanobastões de ouro com polieletrólitos	49
3.1.2.4. Conjugação de nanobastões de ouro-PSS/PAM com GO	50
3.1.2.5. Preparação da solução de glicose e instruções para utilização	50
3.1.2.6. Caracterização do sensor plasmônico	51
3.2. DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO ELETRÔNICO TIPO POCT	51
3.2.1 Materiais e componentes eletrônicos	51
3.2.2 Arquitetura do sistema de medição	52
3.2.3 Calibração e análise estatística	54

3.2.4 Parâmetros de desempenho do <i>POCT</i>	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. SENSOR PLASMÔNICO	56
4.2. FABRICAÇÃO DAS UNIDADES ESTRUTURAIS DO <i>POCT</i>	65
4.3. ANALISADOR CINÉTICO	73
5. CONCLUSÕES	75
6. PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICES	85
APÊNDICE A – Algoritmo-código da interface entre display e <i>POCT</i>	85
APÊNDICE B – Instrumentação de gravação do chip - PSOC	88
APÊNDICE C – Diagrama de blocos com circuito de ganho	89
APÊNDICE D – Estação de solda para circuito SMD, marca YA XUN 702	89
APÊNDICE E – Apresentação do <i>POCTV3</i>	90
ANEXOS	91
ANEXO 1 – Tabelas de valores do teste t de Student	91
ANEXO 2 – Tabelas de valores críticos de F para o teste-F	91
ANEXO 3 – Configuração eletrônica e dados do PSOC	92
ANEXO 4 – Pinagem do dispositivo <i>POCT</i>	99
ANEXO 5 – Dados experimentais do <i>POCT</i> para detecção de Troponina-I	100

1 INTRODUÇÃO

O instante científico que nos cerca é impulsionado por tendências, a exemplo da velocidade nos avanços em telecomunicações, memórias de computador e processamento de dados; a inovação baseada na crescente necessidade de novas tecnologias e a diversidade do avanço onde tecnologias alicerçadas em nanotecnologia, juntamente com fotônica, podem refletir isso. Uma abordagem multidisciplinar parece ser o caminho para materializar tais tendências.

As últimas décadas testemunharam a aplicação de diferentes domínios do conhecimento, a exemplo da eletrônica que em sua mais ampla visão oferece oportunidades para interações entre áreas, tradicionalmente díspares. Já a nanotecnologia é um campo que inclui e faz uso de fundamentos de física, química, biologia e outras áreas do saber. Um dos diversos desafios da nanotecnologia é a viabilizar sensores específicos para aplicações analíticas, dotados de sensibilidade e especificidade muito maiores que sensores tradicionais.

Na área médica, novas formas de diagnóstico fotônico, baseadas em métodos moleculares e não-invasivos, podem reconhecer os pré-estágios e o aparecimento de uma doença como o câncer e, portanto, promover uma grande inovação. A nanomedicina, combinada com a terapia guiada por luz, vai crescer diante daquelas de reconhecimento molecular e, portanto, terá efeitos colaterais mínimos (PRASAD, 2003).

Quando as escalas passam a ser nanométricas, ou seja, na estreita faixa de 1 a 100 nm, as propriedades eletrônicas dos materiais mudam consideravelmente em função de tamanho, formato e distância entre nanoestruturas. Nanopartículas de ouro, por exemplo, apresentam mudança em algumas propriedades ópticas, tornam-se compatíveis com biomoléculas e têm sido aproveitadas em química analítica, biossensores e imunoensaios. Segundo Robenson (2006), em termos de propriedade intelectual, fica clara a orientação dos Estados Unidos sobre a questão de definição do tamanho 1-100 nm, a qual também é aceita no Brasil para nanotecnologia, sem maiores problemas ou discussões.

Segundo Guiochon e Beaver (2004) os protocolos de análises químicas tornam-se cada vez mais eficientes, surgem instrumentos e procedimentos os quais possibilitam um avanço dos sistemas analíticos, permitindo assim a obtenção de menores limites de detecção e redução acentuada no tempo total da análise. Neste contexto surge a plasmônica com o papel de elucidar efeitos eletrodinâmicos e modificação do ambiente dielétrico circunvizinho às nanoestruturas metálicas (PRASAD, 2004) e em particular, através do emprego de

ressonância localizada de *plasmon* de superfície (*LSPR*). Com este, pode-se esperar desempenho distinto e com alta resolução, indicando que as detecções podem ser realizadas utilizando o efeito de ressonância de *plasmon* em resposta à variação do índice de refração.

Nanobastões de ouro (NBAu) são nanoestruturas que têm atraído interesse por suas propriedades em eletrônica e óptica (HUANG *et al*, 2006; DING *et al*, 2007) pois apresentam duas bandas de *plasmon* distintas, uma no modo transversal e uma no modo longitudinal. Esta peculiar propriedade óptica implica em aplicações sensoriais biológicas e químicas. O método de automontagem ou *LBL* (*layer-by-layer*) para a preparação de NBAu revestidos com polieletrólitos tem sido relatado (GOLE, 2005; HU *et al*, 2005), indicando que polieletrólitos são eficazes para a modificação de nanobastões e revestimento dos mesmos resultando em elementos de suporte na construção de nanosensores.

Proteínas têm sido tradicionalmente imobilizadas sobre superfícies por uma variedade de técnicas, incluindo adsorção física, ligação covalente e eletropolimerização (LVOV; MÖHWALD, 2000). A imobilização da enzima é um dos fatores determinantes no desenvolvimento de sensores. Sensores enzimáticos que trabalham com glicose oxidase são específicos e estáveis (DAVIS *et al*, 1995) e por isso justifica-se o investimento em tecnologias, como a apresentada neste trabalho, que possam explorar ao máximo potencial do complexo enzima-substrato.

Neste trabalho foi desenvolvido um dispositivo eletrônico para teste laboratorial remoto ou *point-of-care testing* (*POCT*) para detecção de glicose, sendo três as suas unidades estruturais: a fonte de luz, o sensor plasmônico e o transdutor de sinal. Para o elemento bioseletivo, foi proposto um sensor plasmônico, formado por NBAu funcionalizados com polieletrólitos e conjugados com a enzima glicose oxidase (GO). A morfologia dos NBAu foi obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os processos de automontagem *LBL* foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis-NIR e a estabilidade do sensor plasmônico foi avaliada pelo instrumento desenvolvido.

1.1 PLASMÔNICA

A plasmônica tem como base a ressonância gerada pela interação da luz com filmes finos metálicos, também conhecida como Ressonância de *Plasmon* de Superfície (*SPR*, *Surface Plasmon Resonance*). Este fenômeno tem estreita relação com nanofábricas e tecnologias de sensores usados para a leitura de bases de DNA (TAN *et al*, 2010), interações proteína-proteína (LARSSON *et al*, 2007; BUKASOV *et al*, 2010), eventos de superfície envolvendo ligações cruzadas em membranas (GALUSH *et al*, 2009) e reconhecimento antígeno-anticorpo (KIM *et al*, 2011).

A Figura 1 mostra a configuração de Kretschmann (VAN GENT *et al*, 1990; MELENDEZ *et al*, 1997), onde a luz incide sobre o prisma que possui um filme fino metálico em uma das faces em um ângulo de incidência que permita a condição de reflexão interna total. O campo evanescente criado nessa reflexão irá excitar o *plasmon* de superfície que se propaga na direção paralela ao filme metálico.

Estende-se a aplicação de *SPR* num filme fino, a qual apresenta desvantagem devido ao sistema volumoso e de baixa resolução espectral (LEE *et al*, 2009; SVEDENDAHL *et al*, 2009), utilizando-se nanoestruturas metálicas. Quando a *SPR* é localizada na interface nanoestrutura metálica e dielétrico circunvizinho, surge um campo eletromagnético forte e propício à detecção óptica. Os elétrons-livres confinados neste espaço configuram um fenômeno semelhante, conhecido por Ressonância Localizada de *Plasmon* de Superfície (*LSPR*, *Localized Surface Plasmon Resonance*) (HAES *et al*, 2004; HAES *et al*, 2005). Este efeito é dependente da geometria da nanoestrutura.

Ao aproximarem-se da superfície, os eventos de conjugação ou ligação biomolecular podem ser monitorados através da mudança de comprimento de onda de pico *LSPR*, ao passo que possui uma vantagem em relação ao *SPR*: a *LSPR* não depende do ângulo de incidência da luz nas nanoestruturas. Esse fenômeno baseia-se na quantização das oscilações naturais e locais da nuvem eletrônica das nanoestruturas.

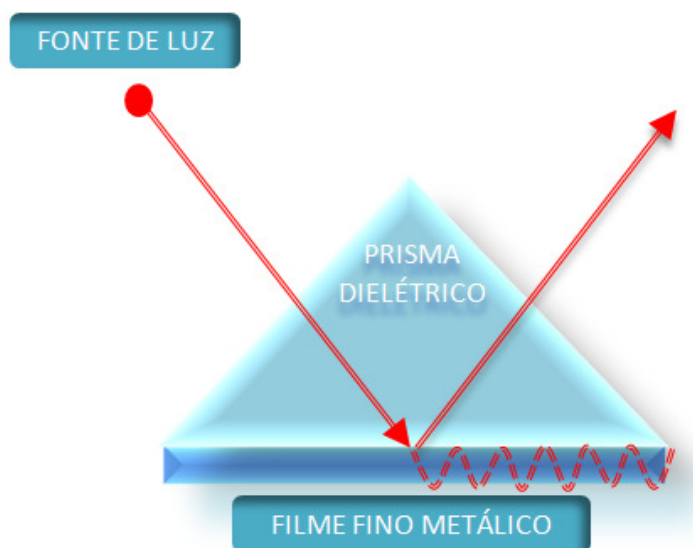


Figura 1 - Configuração de KRETSCHMANN. Adaptada de VAN GENT *et al* (1990).

1.1.1 Ressonância localizada de *plasmon* de superfície

Ao interagir com uma superfície metálica, a radiação eletromagnética excita elétrons-livres do metal, causando polarização. Porém, se reduzirmos bastante o tamanho do material metálico no qual a luz incide, haverá uma mudança na interação da luz com o metal. As propriedades ópticas das nanoestruturas metálicas são objetos de estudo de muitas áreas científicas (CLEMENS *et al*, 2005; DANIEL *et al*, 2004; HUTTER *et al*, 2004). Nesse caso, a luz interage com partículas muito menores que o comprimento de onda incidente (partículas com tamanho igual a poucas dezenas de nanômetros e comprimentos de luz com algumas centenas de nanômetros) e o que se tem é a oscilação local da nuvem eletrônica em torno da nanopartícula.

A Figura 2 ilustra como a nuvem eletrônica de esferas metálicas se comporta frente a um campo eletromagnético. A consequência disso, de forma análoga ao caso de *SPR*, é o surgimento de um valor mínimo detectado como sinal de saída, chamada frequência de *LSPR*. A *LSPR* em termos práticos possibilita uma ampla variedade de aplicações em dispositivos sensores.

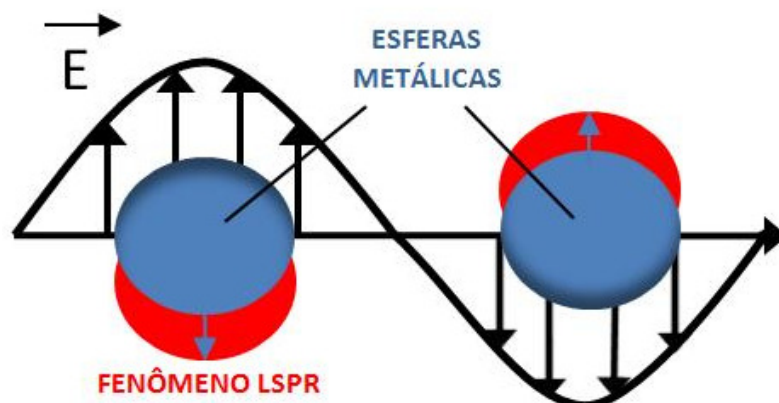


Figura 2 - *LSPR* produzida pela interação entre os elétrons livres de esferas metálicas e uma onda eletromagnética incidente. Adaptada de KELLY (2003).

O físico alemão Gustav Mie (1908) utilizou as equações de Maxwell (1873) e esclareceu interações entre *plasmon* de superfície e seu efeito na estabilidade de soluções formadas por nanoestruturas esféricas individuais, com dimensões menores que o comprimento de onda da radiação incidente. Atualmente, métodos numéricos vêm somando-se à teoria de Mie para elucidar o comportamento espectral de partículas menores que 10 nm e também de outras estruturas mais complexas.

Para nanopartículas metálicas no formato de nanobastões, a banda de *plasmon* se divide em duas bandas que surgem das oscilações dos elétrons-livres (LINK; EL-SAYED, 1999), nas direções longitudinal e transversal ao eixo principal do nanobastão. A Figura 3 mostra esta divisão para um NBAu. A ressonância de modo transversal é semelhante àquela observada para nanoesferas, já a longitudinal é deslocada para o vermelho, dependendo fortemente da razão de aspecto, que é o comprimento dividido pela largura do nanobastão.

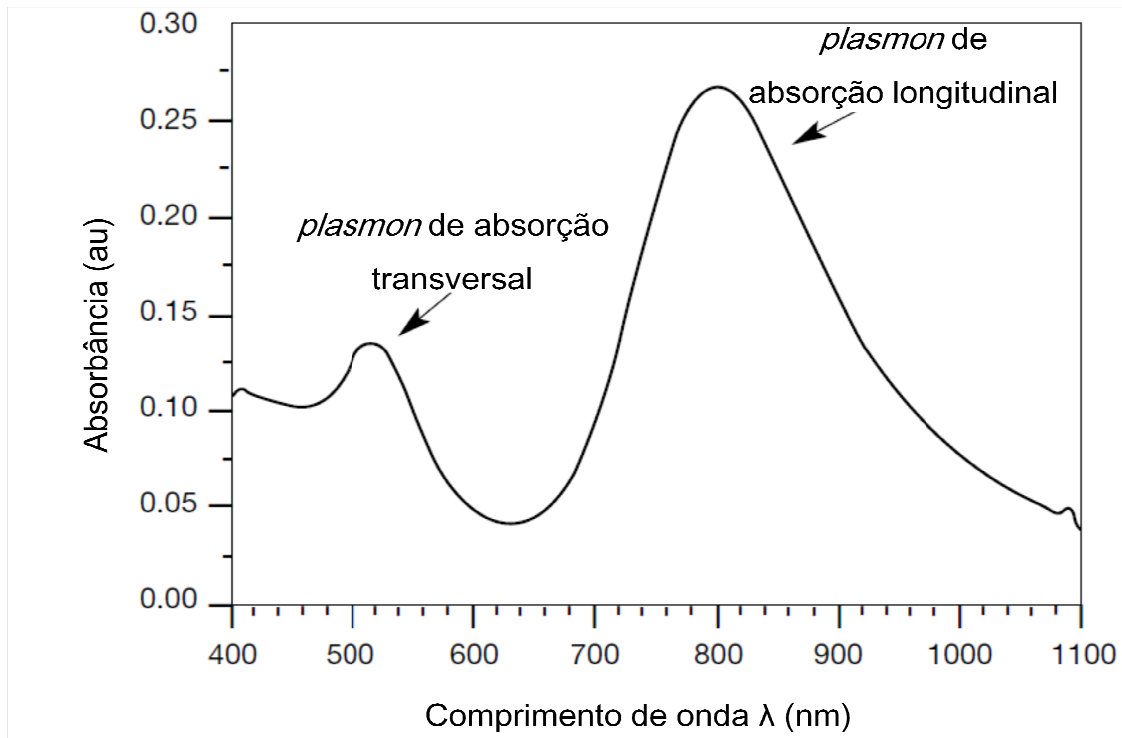


Figura 3 - Absorância do NBAu. Adaptada de LINK; EL-SAYED (1999).

O modelo clássico de Mie (BORN; WOLF, 1998) é frequentemente usado para descrever as propriedades ópticas de nanopartículas de metais. Muitas vezes utiliza-se um dipolo em que a oscilação de elétrons de condução (oscilações de *plasmon*) impulsionado pelo campo eletromagnético da luz, produz oscilação do dipolo ao longo da direção de campo onde os elétrons são dirigidos para a superfície da nanopartículas como mostrado na Figura 2. Uma teoria mais rigorosa (KELLY *et al*, 2003) mostra que este deslocamento tipo dipolar é aplicável às partículas de tamanho menor e dá origem a um coeficiente de extinção dado pela seguinte equação (KREIBIG; VOLLMER, 1995):

$$\sigma_{ext}(\omega) = \frac{12\pi\epsilon_d^{3/2}R^3\omega}{c} \left| \frac{\epsilon''}{(\epsilon' + 2\epsilon_d)^2 + (\epsilon'')^2} \right| \quad (1.1)$$

onde ω é a frequência da radiação eletromagnética, ϵ_d é a constante dielétrica do meio, ϵ' e ϵ'' são as componentes real e imaginária da função dielétrica, R é o raio da partícula e c é a velocidade da luz. A ressonância é atingida quando ϵ' é igual a $-2\epsilon_d$, e se ϵ'' é muito pequeno (PINCHUK *et al*, 2004). A equação (1.1) é uma versão simplificada da fórmula de Mie e é válida para nanoestruturas sob a influência de uma mesma fase da onda eletromagnética ($\lambda \gg 2R$) (GEDDS; LAKOWICZ, 2005).

1.2 NANOESTRUTURAS METÁLICAS

Nanoestruturas metálicas circunvizinhas a materiais dielétricos apresentam um forte coeficiente de extinção óptica (espectro de absorção e dispersão) no comprimento de onda onde ocorre *LSPR*. A extinção pode ser descrita como uma combinação de absorção e de dispersão, onde a absorção aumenta proporcionalmente com o volume das partículas e a dispersão aumenta proporcionalmente ao quadrado do volume de partículas (ROTELLO, 2004). A dispersão de luz ocorre quando um elétron oscilante emite radiação eletromagnética com a mesma frequência de oscilação do elétron. Assim, quando iluminar uma partícula com uma certa frequência, os elétrons vão oscilar na mesma frequência e dispersar a luz com o comprimento de onda correspondente, resultando em extinção da luz. Já a absorção de luz na extinção é resultante da transformação da luz em calor (YGUERABIDE, 1998). A maior absorção de dipolos oscilantes é feita na sua frequência de ressonância, o que para as nanopartículas de ouro situa-se no espectro de luz visível (GEDDS; LAKOWICZ, 2005). Na Figura 4 podemos conhecer limites de absorção espectral em várias morfologias para nanopartículas e nanoestruturas anisotrópicas, como é o caso dos nanobastões.

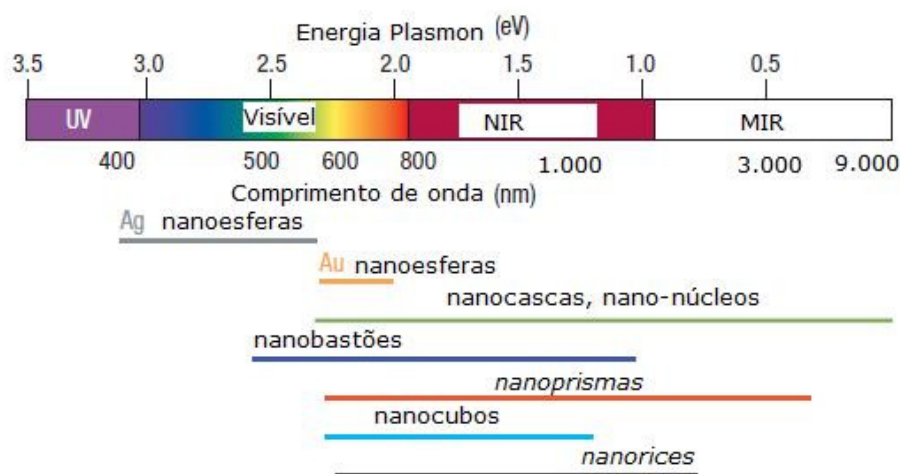


Figura 4 – Espectro eletromagnético com limites de *plasmon* em várias morfologias de nanopartículas. Adaptada de LAL *et al* (2007).

A Tabela 1 apresenta a variedade de nanoestruturas disponíveis, as quais despontam na biomedicina, na liberação controlada de fármacos e na bioeletrônica (MURPHY *et al*, 2005; LITTLE *et al*, 1982; KENNERLY *et al*, 1984; LI *et al*, 2010; UNG *et al*, 2002; CHAN *et al*, 2008).

Tabela 1 - Características de nanoestruturas plasmônicas. (UIR: Unidade de Índice de Refração). Adaptada de TAERIN *et al* (2011).

Comprimento de onda	Nanoestrutura	Dimensão	Característica	Sensibilidade do Sensor	Variação do IR	Referências Bibliográficas
450–700 nm	Nanopartículas esféricas de Prata	Diâmetro: 35 nm	LSPR dependente da forma	161 nm/UIR	1–1,6	(MCFARLAND <i>et al</i> , 2003)
450–700 nm	Nanopartículas triangulares de Prata	Diâmetro: 35 nm	LSPR dependente da forma	197 nm/UIR	1–1,6	(MCFARLAND <i>et al</i> , 2003)
800–1000 nm	Nanobastões de Ouro	Razão de aspecto: 3,5:1 Raio: 40 nm	LSPR dependente do tamanho	650 nm/UIR	1,34–1,7	(LEE; EL-SAYED, 2006)
450–600 nm	Nanopartículas coloidais de Ouro	Diâmetro: 30 nm	LSPR dependente da forma	70,9 nm/UIR	1,32–1,5	(SUN; XIA, 2002)

1.2.1 Estabilidade de nanoestruturas

O controle do número de unidades por volume, dimensão e forma geométrica das nanoestruturas são fundamentais para o funcionamento de nanosensores baseados em *LSPR*. A qualidade da síntese é determinante na engenharia molecular e garante a estabilidade do elemento bioseletivo em presença de surfactantes como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), o qual liga-se quimicamente aos NBAu levando-os a adquirir cargas iguais e logo a se repelir, resultando em conformação coloidal estável. Contaminação por impurezas, falhas de esterilização, matéria-prima de baixa qualidade, ausência de monitoramento nos parâmetros físico-químicos como pH e temperatura podem gerar precipitação. A presença de forças de Van der Waals aumentam com o tamanho das nanoestruturas e resultam em precipitação (ISRAELACHVILI, 1992).

Na Figura 5 pode-se perceber o fenômeno da precipitação de nanobastões de ouro durante a etapa de recobrimento de superfície. Estudos de estabilidade são realizados por meio de reflectometria angular de varredura (SAR) e abordam a interação entre proteínas e polieletrólitos de diferentes cargas superficiais (LADAM *et al*, 2000). Descobriu-se a intensidade destas interações, mesmo quando a rede de carga total das proteínas era diferente da carga presente em poucos sítios sobre sua superfície, permitindo ligações localizadas das proteínas à superfícies de cargas diversas (LADAM *et al*, 2001; LADAM *et al*, 2002).



Figura 5 – Precipitação de nanobastões de ouro.

A padronização das concentrações dos reagentes impacta diretamente na geração das cargas superficiais e na estabilidade das nanoestruturas.

1.2.2 Estabilizantes, polieletrólitos e funcionalização

Métodos diversos têm sido utilizados para sintetizar nanoestruturas a partir de metais nobres, sendo classificados em químicos (por exemplo, redução química, redução fotoquímica, co-precipitação, hidrólise, decomposição térmica, etc.) e físicos (deposição de vapor, ablação a *laser*, etc.) (ROSA, 2013). Destaca-se aquele de Sau (2004), modificado de El-Sayed (1999), baseado em redução química de sais do metal por compostos redutores, tais como tetrahidroborato(III) de sódio, citrato de sódio, ácido ascórbico e formamida.

Há uma tendência à aglomeração de NBAu durante o processo de redução química. A fim de evitar a agregação de superfícies de maior energia, recorre-se a agentes estabilizantes, entre eles materiais poliméricos de alta viscosidade com propriedades de interação intra e intermolecular. Surfactantes são substâncias que agem como passivantes para garantir a estabilidade da solução coloidal através da repulsão entre nanopartículas. Dentro dessa classe pode-se citar o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), que se liga quimicamente aos NBAu e é polarizado de maneira que as nanopartículas que possuem cargas iguais entre si se repelem, possibilitando a estabilização do sistema.

1.2.2.1 Poliestireno sulfonato de sódio (PSS)

A funcionalização de NBAu é usualmente relacionada a interações eletrostáticas ou a ligações covalentes (IPE *et al*, 2002; JENNINGS *et al*, 2006). As interações eletrostáticas são muito fracas, consequentemente, sensíveis a variações de pH ou forças iônicas externas. Já as ligações covalentes são fortes, extremamente versáteis, possuem alguns grupos químicos, especialmente tióis (HÄKKINEN, 2012) que podem reagir com superfícies de ouro (ROSA, 2013). Um exemplo é o PSS aplicado neste trabalho, polieletrólito utilizado no recobrimento de nanopartículas, possui alta seletividade espacial, facilidade para orientação e formação de plataformas sensoras. Na Figura 6 podemos perceber a estrutura da unidade monomérica do PSS e o grupamento $\sim\text{SO}_3\text{H}$, o qual lhe confere alta reatividade:

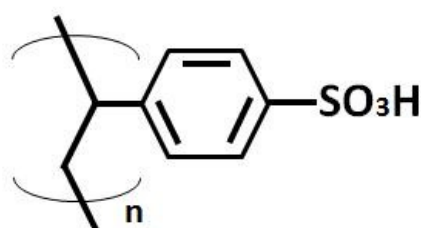


Figura 6: Estrutura da unidade monomérica do PSS.

1.2.2.2 Poliacrilamida (PAM)

Este polieletrólito apresenta em sua estrutura o monômero acrilamida, como principal constituinte. A Figura 7 apresenta a estrutura monomérica da PAM, a qual é solúvel em formamida, etilenoglicol, soluções aquosas salinas e água.

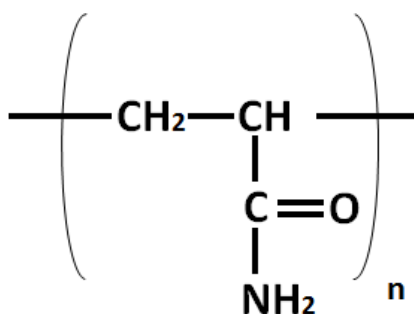


Figura 7- Estrutura da unidade monomérica da PAM.

A PAM se destaca entre os polímeros sintéticos por sua capacidade de floculação de sólidos em suspensão, o que lhe confere um lugar de destaque entre os mais vendidos (YANG; SHEN, 2010). Podem ser quimicamente modificadas para torná-las catiônicas, aniônicas ou anfóteras. Auxilia, como agente de contraste, aplicada em ressonância magnética

(óxido de ferro imerso em partículas de PAM). Já na forma de nanosensores ópticos, compõe o centro para a produção fotoquímica objetivando o tratamento de células cancerígenas (OHDE *et al*, 2007). Nesta dissertação foi montada uma camada deste polieletrólito para possibilitar a conjugação com a enzima GO. Etapas de funcionalização desta natureza, sobre o PSS, têm sido relatadas, como por exemplo a utilização de polidialildimetilamônioclorado (pDADMAC) (ZHANFANG; DING, 2009). A aplicação de PAM catiônica foi uma solução inovadora apresentada, pois normalmente a PAM é disponibilizada na sua forma aniônica.

1.3 ENZIMAS

As enzimas são biopolímeros formados em sua maioria por aminoácidos. Enzimas são amplamente utilizadas em química e áreas correlatas. Podem ser conjugadas a outras espécies químicas em sistemas para detecção e quantificação de antígenos, células e moléculas em geral (HERMANSON, 2008). São de natureza protéica, com exceção de algumas constituídas por ácidos ribonucleicos. Catalisam a maioria absoluta das reações que se passam intra e extracelularmente, degradam, conservam, e transformam macromoléculas biológicas a partir de precursores simples (NELSON; COX, 2002).

A depender da engenharia molecular envolvida, as enzimas podem funcionar como elemento bioseletivo de sensores, pois biocatalizam reações em alto grau de seletividade e agem especificamente sobre determinado substrato. O potencial catalítico de enzimas é, em geral, muito maior que o de catalisadores sintéticos ou inorgânicos (NELSON; COX, 2002; WOOLERTON *et al*, 2012). Seus monômeros de aminoácidos são unidos por ligações peptídicas, todos contendo um grupo amino ($-NH_2$) e um grupo carboxila ($-COOH$) ligados ao mesmo carbono (α -carbono). Os α -aminoácidos diferem uns dos outros por suas cadeias laterais (R). A Figura 8 (a) representa ligações peptídicas entre um grupo aminoterminal $-NH_2$ de um aminoácido com o grupo carboxiloterminal $-COOH$ de outro aminoácido, formando uma amida na Figura 8 (b) (MOTTA, 1901).

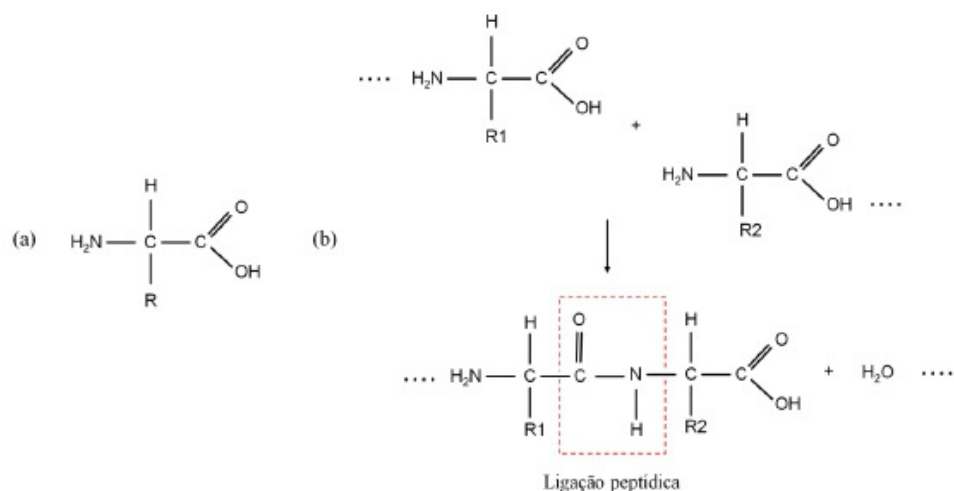


Figura 8 - Estrutura de um aminoácido (a) e de uma ligação peptídica (b) (MOTTA, 1901).

A estrutura das enzimas segue a das proteínas. Existem quatro níveis de organização para descrevê-las: primária, secundária, terciária e quaternária (GEOFFREY; HAUSMAN, 2000). A sequência de aminoácidos é chamada de estrutura primária. Interações regulares de pontes de hidrogênio, dentro dos segmentos de cadeias polipeptídicas adjacentes, originam α -hélices e folhas β -pregueadas, as quais constituem o primeiro nível de dobramento chamado de estrutura secundária. A combinação do segundo e terceiro nível de dobramento é comumente chamada de estrutura terciária, a qual representa um polipeptídeo (monômero). Ao unir subunidades de polipeptídios (dímero) temos a estrutura quaternária (ALBERTS *et al*, 1997). Na Figura 9 diferenciamos os níveis de organização em uma proteína (NELSON; COX, 2002).

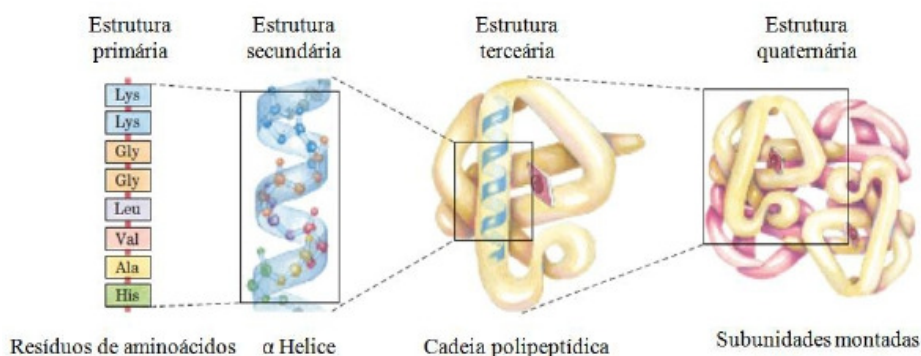


Figura 9 - Níveis de organização de uma proteína (NELSON; COX, 2002).

Por uma recomendação da União Internacional de Bioquímica, em 1984, cada enzima tem um nome associado a um número de 4 dígitos. O número EC (*Enzyme Commission*)

divide as enzimas em classes, de acordo com os tipos de reações por elas catalisadas. A Tabela 2 mostra a classificação internacional das enzimas (FERNANDES, 2005).

Tabela 2 - Classificação internacional das enzimas (FERNANDES, 2005).

1. <i>Oxiredutases</i> (reações de oxiredução ou transferência de elétrons – <i>Desidrogenases e Oxidases</i>)			
1.1.atuando em CH-OH 1.2.atuando em C=O 1.3.atuando em C=O- 1.4.atuando em grupo amino (CH-NH ₂) 1.5.atuando em CH-NH- 1.6.atuando em NADH, NADPH			
2. <i>Transferases</i> (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil – <i>Quinases e Transaminases</i>)			
2.1.grupos com um carbono 2.2.grupos aldeído ou cetona 2.3.grupos acil 2.4.grupos glicosil 2.5.grupos fosfatos 2.6.grupos contendo enxofre			
3. <i>Hidrolases</i> (reações de hidrólise de ligação covalente - <i>Peptidases</i>)			
3.1.ésteres 3.2.ligações glicosídicas 3.3.ligações peptídicas 3.4.outras ligações C-N 3.5.anidridos ácidos			
4. <i>Liases</i> (catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico – <i>Dehidratases e Descarboxilases</i>)			
4.1. =C=C=	4.2. =C=O	4.3. =C=N-	
5. <i>Isomerases</i> (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos - <i>Epimerases</i>)			
5.1.racemases			
6. <i>Ligases</i> (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre às custas de energia - <i>Sintetases</i>)			
6.1. C-O	6.2. C-S	6.3. C-N	6.4. C-C

1.3.1 Glicose oxidase

A glicose oxidase (GO) é uma flavoenzima que catalisa a oxidação da β -D-glicose em δ -D-gluconolactona (WOHLFAHRT *et al*, 2004; O' MALLEY; WEAVER, 1972). Segue-se a esta reação uma hidrólise espontânea do substrato em ácido glucônico e formação de peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (WOHLFAHRT *et al*, 2004). Pertence a classe das oxiredutases com EC 1.1.3.4, diâmetro médio de 8 nm (WILSON, 1992), a GO possui o formato esferóide e dimensões 60 Å x 52 Å x 37 Å, representado na simulação computacional da Figura 10 (a) (SANTOS, 2012). Apresenta sítio ativo ao se ligar com o cofator flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), em destaque na cor vermelha no modelo de fitas (VIEIRA, 2006) da Figura 10 (b).

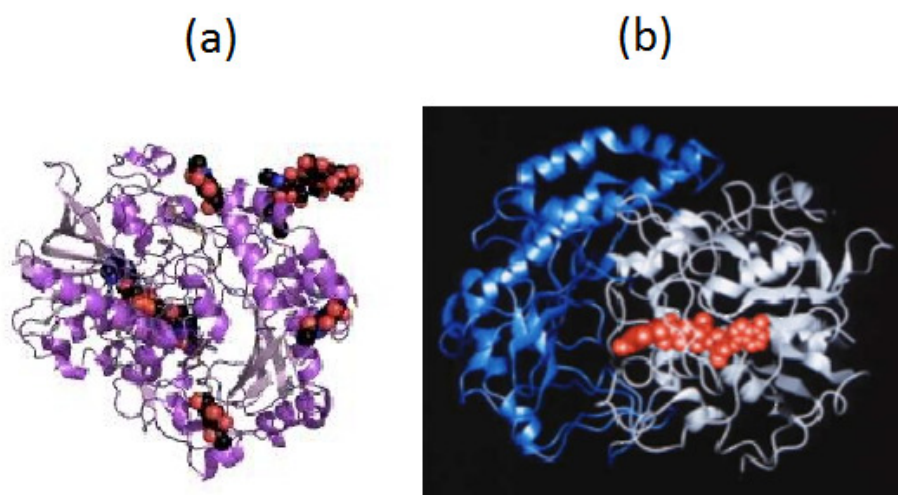


Figura 10 - Simulações computacionais da enzima glicose oxidase (SANTOS, 2012) (a) e da reação carboidrato, enzima-cofator representados no modelo de fitas para estruturas moleculares (b) (VIEIRA, 2006).

A GO foi descoberta em 1928 por Muller e é obtida a partir do *Aspergillus niger*, *Penicillium notadum* e naturalmente por outros fungos e insetos (WILSON, 1992; CHUN *et al*, 2008). Sua grande vantagem está na estabilidade, especificidade e baixo custo de obtenção (VILLALBA *et al*, 2011; KAUSHIK *et al*, 2008; QIU *et al*, 2009). É amplamente utilizada em biosensores para detecção de concentrações de glicose em fluidos fisiológicos e várias publicações trazem métodos de determinação do peróxido de hidrogênio também formado na catálise (MURPHY, 2006). Na Figura 11 pode-se visualizar o aspecto da solução de GO (EC 1.1.3.4, 211 U mg^{-1} de *Aspergillus niger*) em concentração de 300 mg/dL. O pH ótimo é de 5,5, mas opera relativamente bem na faixa de pH 4 a 7. Para valores de pH maiores que 4,2

pode formar filmes, *layer-by-layer (LBL)* com polieletrólitos aniônicos (O'MALLEY; WEAVER, 1972; SUN *et al*, 2001; XIN *et al*, 2003).

Na Figura 12 a GO oxida a molécula de glicose utilizando o oxigênio molecular como aceitador de elétrons, gerando o peróxido de hidrogênio, já o produto intermediário enzima- FADH_2 é oriundo da redução do complexo enzima-FAD. (O'MALLEY; WEAVER, 1972; LESKOVAC *et al*, 2005).



Figura 11- Aspecto da solução enzimática a 300mg/dL de GO.

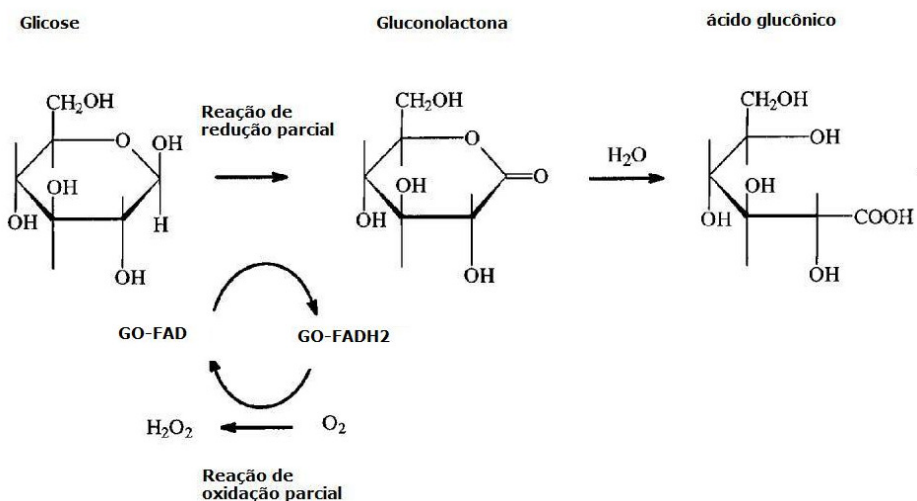


Figura 12- A GO oxida a molécula de glicose. Adaptada de WITT *et al* (2000).

1.4 TÉCNICA *LAYER-BY-LAYER* (LBL)

A técnica consiste na adsorção espontânea, física ou química, de materiais sobre superfícies suporte resultando em filmes que também podem ser formados por enzimas e outras biomoléculas, através de interações altamente específicas. Filmes como estes, baseados em interações eletrostáticas, contendo polieletrólitos, foram propostos em trabalhos pioneiros de SAGIV (1980) e reformulados por DECHER *et al.* (1992, 1997). Essa técnica é conhecida por automontagem ou *LBL* (*layer-by-layer*). A vantagem está na adsorção por interações iônicas, não havendo formação de ligação covalente, permitindo assim que uma grande variedade de materiais possa ser utilizada (ARIGA *et al.*, 2007; DECHER; SCHLENOFF, 2003).

Na *LBL*, uma solução de polieletrólito é posta em contato com o substrato sólido, por um tempo determinado. Então, é imersa em uma solução de polieletrólito de carga oposta à inicial durante um tempo. Em seguida é imersa numa solução de lavagem para remover as moléculas livres que não reagiram e enfim colocada na solução de polieletrólito inicial para formação de nova camada. Então, é novamente imersa na solução de lavagem e removida, obtendo assim a segunda camada. A repetição sistemática desse processo leva a filmes finos. Tem-se assim uma montagem que mantém a função dos reagentes. As sínteses coloidais apresentadas neste trabalho remetem ao princípio da automontagem.

1.5 FOTOMETRIA

O estudo da medição da energia contida na radiação óptica e seu modo de propagação através de sistemas ópticos são tratados pela radiometria, assumem-se para este estudo as leis da óptica geométrica. Em contrapartida, a fotometria restringe-se a quantificar a luz de um espectro eletromagnético susceptível de induzir uma resposta visual (FERREIRA, 2003). Quando o comprimento de onda da luz incidente em uma amostra é selecionado por prismas ou grades de difração temos a espectrofotometria (BURTIS *et al.*, 2008).

O dispositivo utilizado como emissor de radiação eletromagnética apresenta um fluxo radiante, de potência definida. Este fluxo é uma grandeza radiométrica suficiente para estimular o fenômeno da *LSPR*. A equação matemática que define a intensidade da luz que atravessa um material é expressa como a lei de Beer (BURTIS *et al.*, 2008; PETER, 1996), demonstrada pela equação

$$I = I_0 \times e^{-\mu l} \quad (1.2)$$

onde:

I_0 é a intensidade do feixe incidente, I é a intensidade do feixe transmitido após atravessar um caminho de comprimento l centímetros e μ é o coeficiente de absorção linear para o material. O valor de μ é uma função de energia do feixe e da composição elementar do material. Esta grandeza está relacionada com a parte imaginária “ k ” do índice de refração complexo e é conhecida como constante de extinção, a qual representa uma fração da intensidade da radiação eletromagnética que é absorvida por unidade de distância, sendo uma função do comprimento de onda λ . A relação é apresentada por:

$$\mu = \frac{4\pi k}{\lambda} \quad (1.3)$$

Outra equação de interesse é dada por:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (1.4)$$

onde A é a absorbância da luz monocromática e representa a capacidade de uma substância absorver radiação. Então, substituindo a equação (1.2) na equação (1.4), temos $A = \mu l$. O coeficiente de absorção μ e A estão relacionados pela lei de Beer-Lambert. Nos trabalhos com soluções esta absorbância é correlacionada com a concentração do composto absorvido, com o objetivo de definir o valor de ε . A equação é expressa por:

$$A = \varepsilon c l \quad (1.5)$$

onde ε é o coeficiente de absorção molar expresso em [litros/(mol.cm)], uma constante de proporcionalidade definida como absorvidade molar, c é a concentração molar da solução, usualmente expressa em [g/litro] ou [mol/litro] ou [M] e l é o comprimento do caminho em centímetros. Em moléculas observam-se transições eletrônicas que consistem na promoção de elétrons de orbitais no estado fundamental para orbitais vazios. A molécula torna-se, então, um

estado excitado (VALEUR, 2001). A transição eletrônica depende da diferença de energia entre os dois estados daquela molécula. As energias dos orbitais envolvidos têm valores fixos, e quando a energia é quantizada, os espectros de absorção deveriam ser picos bem definidos, entretanto apresentam-se mais largos devido a presença de níveis de energia vibracional, e mesmo rotacional (ROSA, 2013). Uma representação esquemática dos estados eletrônicos, durante a absorção, pode ser observada na Figura 13.

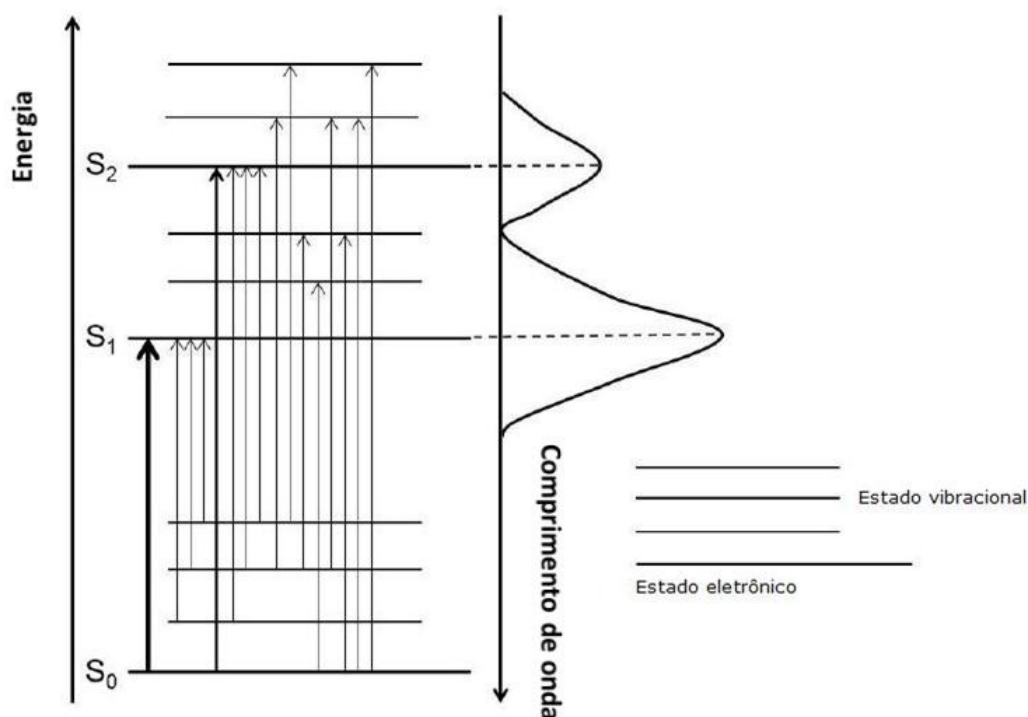


Figura 13 - As linhas horizontais reproduzem estados eletrônicos, sendo: S₀ (fundamental), S₁ e S₂ (excitados). Já as linhas intermediárias reproduzem estados eletrônicos vibracionais. As transições eletrônicas seguem na direção das linhas verticais e no lado direito da figura percebe-se que há uma correlação das transições com espectros de absorção. Os estados rotacionais não foram representados. Adaptada de ROSA (2013).

Métodos espectrométricos são baseados na interação da radiação eletromagnética com o sensor podem ser classificados em quatro categorias principais: 1- Emissão Atômica, onde a radiação emitida por espécies atômicas do sensor é convertida em medidas qualitativas e quantitativas; 2- Luminescência, onde a emissão de radiação origina-se do sensor excitado. Métodos espectrométricos que utilizam esse princípio são Quimiluminescência, Espectrometria de Fluorescência Molecular, Espectrometria de Fluorescência Atômica e Espectrometria de Fosforescência; 3- Espalhamento, o qual aplica o princípio do espalhamento

da radiação como medida e pode-se citar como métodos derivados deste, a Espectrometria Raman, Turbidimetria e Nefelometria; 4- Absorção, cujo princípio é a absorção da radiação qualitativa e quantitativamente. Métodos espectrométricos derivados deste, a Espectrometria de Absorção Molecular e Espectrometria de Absorção Atômica (SKOOG *et al*, 2002).

Dentre os diversos métodos abordados selecionou-se a Espectrometria de Absorção Molecular UV-Vis-NIR, em virtude da facilidade de operação, baixos erros relativos em termos de concentração e necessidade de faixa espectral específica (SKOOG *et al*, 2006).

1.5.1 Fotômetro e seus componentes

Fotômetros trabalham num intervalo de comprimento de onda do espectro eletromagnético, associado a sua respectiva faixa de frequência. São compostos por: (1) fonte de luz; (2) cubeta ou célula de absorção, para absorver parte da energia radiante; (3) fototransdutor, que converte a luz em sinal elétrico; (4) dispositivo de leitura, formado por um processador e conversor dos sinais a fim de ser exibido digitalmente.

Muitas vezes se faz necessário, logo após a fonte de luz, um sistema de isolamento de energia radiante com comprimento de onda específico excluindo outros comprimentos de ondas, é o chamado filtro ou monocromador. Para este fim são utilizados dispositivos como: filtros, prismas e grades de difração. Além disso, combinações de lentes e fendas são freqüentemente aplicadas para tornar os raios de luz ajustáveis e colimados. Os monocromadores foram dispensados no sistema desenvolvido neste trabalho.

1.5.1.1 Fonte de luz

As fontes luminosas que se destacam nos trabalhos com espectroscopia UV-Vis-NIR são: *laser*, lâmpada incandescente e LED (do inglês *Light-Emitting Diode*). Alguns requisitos devem ser atendidos pela fonte de luz, a fim de ser aplicada em fotômetros, como: Fluxo radiante gerado por potência suficiente para alcançar o fototransdutor; e estabilidade, pois efeitos externos como alterações de temperatura podem comprometer o resultado da leitura.

1.5.1.1.1 Laser

O processo de emissão estimulada constitui a base do funcionamento do laser e foi demonstrado teoricamente por Albert Einstein em 1917. A descoberta, patenteada em 1960,

por Townes e Schawlow é conhecida pelo acrônimo *laser* (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, compreende um dispositivo que também é utilizado como fonte de luz (SHACKELFORD, 2008). Este dispositivo foi praticado por Maiman também em 1960, quando utilizou como meio ativo um pequeno cristal de rubi, com faces paralelas entre si, perpendiculares ao eixo e espalhadas, instalado no eixo de uma lâmpada de descarga helicoidal.

Diferente da fonte de luz tradicional onde as ondas luminosas estão fora de fase entre si e as transições eletrônicas ocorrem aleatoriamente, o *laser* focaliza a luz em um feixe monocromático extremamente intenso e coerente, pois as ondas luminosas estão em fase (BURTIS *et al*, 2008; FERREIRA, 2003). Podem ser obtidos de diferentes materiais, gerando emissões de comprimentos de onda diferentes. A tabela 3 resume os diversos tipos de *lasers* comerciais. A potência desta fonte de luz pode variar de microwatts a 25kW e até mais em aplicações militares, aqueles pulsados geram potências de pico muito altas quando comparados aos de ondas contínuas (SHACKELFORD, 2008).

Tabela 3 – Tipos de *Lasers*, comprimentos de onda em que operam e tipo da potência de saída. Adaptada de BURTS *et al* (2008).

<i>Laser</i>	Comprimento de onda	Tipo de onda	Referências Bibliográficas
Gás, He-Ne (verde) Nitrogênio Argônio (verde)	543,5 – 3390 nm 337 nm 514 nm	Contínua	(HECHT, 1993)
Líquido, Corante Rodamina 6G	320–1000 nm 57- 650 nm	Contínua, Pulsado	(HECHT, 1993)
Vidro, Silicato de Nd	1061 nm	Pulsado	(HECHT, 1993)
Sólido, Rubi (CrAlO ₃)	694 nm	Pulsado	(HECHT, 1993)
Semicondutor, Diodo InGaAsP GaAlAs LED GaAs GaP Si	1200 – 1600 nm 634 – 1660 nm 880 nm 550 ou 700 nm 1100 nm	Contínua	(HECHT, 1993)

1.5.1.1.2 Laser semiconductor

Os lasers semicondutores foram criados em 1962, mas a sua utilização tornou-se corrente apenas na década de setenta, depois de garantir o seu funcionamento contínuo à temperatura ambiente (FERREIRA, 2003; AGRAWAL; DUTTA, 1993). Esta fonte de luz é na verdade um diodo semiconductor, que foi dopado fortemente ($\approx 0,1\%$) e com diferença de potencial também suficientemente forte. Considera-se neste trabalho o *laser* de GaAlAs - arseneto de gálio e alumínio, cujo comprimento de onda pode ser visto na Tabela 3. Nesse caso, os fótons de luz são produzidos pela recombinação de elétrons e buracos através do espaçamento entre as bandas de energia, seguindo a produção de pares elétron-buraco por aplicação de uma diferença de potencial elétrico. O espaçamento entre as bandas de energia, E_g , precisa estar em um intervalo apropriado para que o comprimento de onda do fóton resultante esteja na região de espectro desejada. O comprimento de onda λ , do fóton, pode ser determinado pela seguinte equação (SHACKELFORD, 2008):

$$\lambda = \frac{hc}{E_g} \quad (1.6)$$

E_g = energia equivalente ao espaçamento entre bandas de energia quando um elétron é promovido da banda de valência para a banda de condução, também conhecida como banda de energia proibida;

h = constante de Plank, $6,626 \times 10^{-34}$ J.s

c = velocidade da luz, $2,998 \times 10^8$ m/s

Na representação da Figura 14 indicam-se as dimensões típicas de um *laser* semiconductor, as faces nas extremidades do cristal são cortadas paralelamente entre si e convenientemente polidas, de modo a formar uma cavidade ressonante. A grande diferença entre os índices de refração no semiconductor ($n \approx 3,5$) e no ar ($n \approx 1,0$) faz com que a interface entre os dois meios apresente uma reflectância de cerca de 30%, que é suficiente para constituir aquela cavidade. Percebe-se também a junção p-n formada entre um semiconductor dopado do tipo p e um semiconductor dopado do tipo n. Devido a diferença de concentração dos elétrons e das lacunas nas duas regiões, verifica-se a difusão dos mesmos na região onde se estabelece uma certa diferença de potencial elétrico.

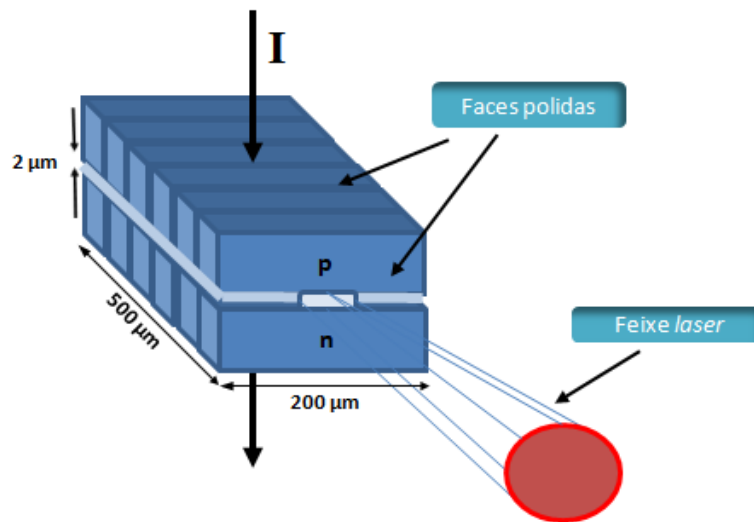


Figura 14 – Representação esquemática de um laser semicondutor. Adaptada de FERREIRA (2003).

Um efeito frequentemente ignorado, mas muito importante, é a influência da temperatura na relação entre potência óptica e corrente no diodo *laser*. A corrente limiar aumenta junto com a temperatura, enquanto a potência óptica e a eficiência diminuem. Assim, um circuito de controle deve possuir um limitador ou um mecanismo de desligamento, para evitar que uma grande variação de temperatura possa danificar o diodo laser. Na Figura 15 percebe-se que a relação entre a potência óptica e a corrente no diodo é linear até a potência máxima – tanto na operação CW (Continuous Wavelength), como na pulsada.

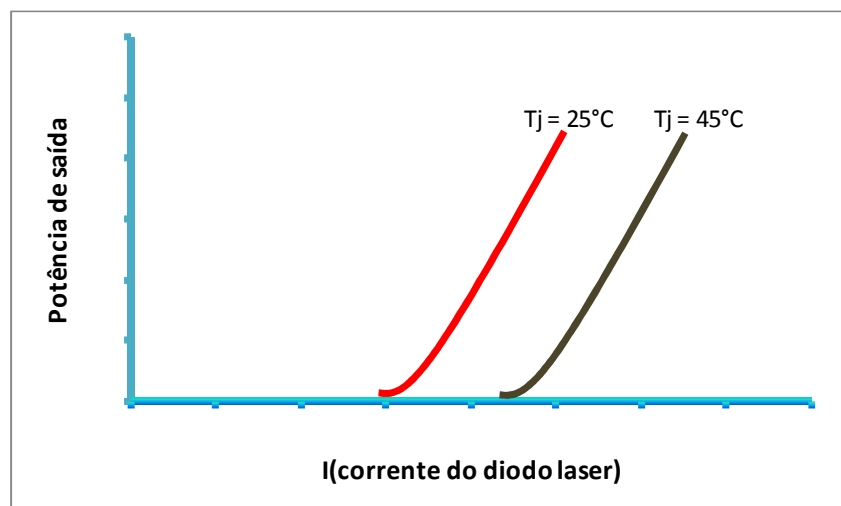


Figura 15 – Curva de potência de um diodo *laser*. T_j =temperatura na junção. Adaptada de MALZAHN (2004).

1.5.1.1.3 Diodo Emissor de Luz

Quando é aplicada uma diferença de potencial no sentido direto da junção p-n, origina-se uma corrente elétrica através da junção e no mesmo sentido, ou seja, os elétrons da região n são injetados para a região p, enquanto as lacunas da região p são injetados na região n. Então surge a radiação óptica por emissão espontânea. Este fenômeno é designado por eletroluminescência de injeção, sendo a base do funcionamento do LED.

O LED é um dispositivo que emite radiação ao conduzir corrente elétrica. Os estudos da eletroluminescência de injeção iniciaram-se no final do século XIX e início do século XX. Henry Joseph Round, em 1907, ao usar carbeto de silício, foi pioneiro ao conseguir a eletroluminescência, dando início aos estudos do LED (FERREIRA, 2003). Já em 1923, O. W. Lossey relatou-a em cristais de carbeto de silício e, E. Destriau em 1937 observou esse fenômeno em sulfeto de zinco. Hall *et al* (1962) construíram, em 1962, o primeiro LED, com arseneto de gálio, emitindo na região do IR, em 840 nm. A maioria dos lasers semicondutores são constituídos a partir da combinação de elementos de terceiro e do quinto grupos da tabela periódica, é o caso da descoberta de Holonyak e Bevacqua (1962) os quais utilizaram fosfeto e arseneto de gálio, emitindo na região de 710 nm, com largura efetiva de banda de 12,5 nm.

O fato da emissão no LED ser espontânea faz com que a luz emitida não seja muito direcionada, apresentando ângulos de divergência gerando resultados pouco eficientes (FERREIRA, 2003).

1.5.1.1.4 Lâmpada de Tungstênio

A fonte de luz para medidas na região visível do espectro é usualmente a lâmpada com filamento de tungstênio, que não fornece energia radiante suficiente para medidas inferiores a 320 nm, quase toda a potência radiante está concentrada na região do infravermelho. Estas lâmpadas têm tempo de vida útil relativamente baixo (≈ 2.000 horas), apresentam alto consumo de energia e flutuações da potência radiante devido ao aquecimento ao operar em até 3000 K (BURTIS *et al*, 2008).

1.5.1.2 Cubeta

Outro componente importante no fotômetro é a célula de absorção também designadas como cubeta ou mesmo *cuvette*. Com o objetivo de manter uma amostra líquida na trajetória

de um feixe de luz, podem apresentar secção transversal redonda, quadrangular ou retangular conforme o padrão do porta-cubeta. São constituídas de diversos materiais, como: polímeros plásticos, vidro ou sílica(quartzo) (BURTIS *et al*, 2008). Aquelas de secção quadrangular ou retangular apresentam superfícies ópticas planas e paralelas, com trajetória de luz constante e 1,0 cm de espessura, o qual define o caminho percorrido pela luz.

Para leituras na região do visível recorre-se a cubetas de material vítreo, como o borossilicato, já para medidas abaixo de 340 nm, no entanto, células de quartzo são exigidas. São variáveis impactantes quanto ao limite de erro, a transparência da cubeta, sua limpeza, resistência a corrosão e deformação por solventes e deformação por temperatura (BURTIS *et al*, 2008). Muitas cubetas plásticas são descartáveis, utilizadas uma única vez. Soluções alcalinas não devem ser deixadas no interior das cubetas por períodos prolongados, muito menos colocadas de molho em solução sulfocrômica para limpeza, já que corroem o vidro.

As cubetas podem induzir a erros sistemáticos, por isso devem ser manipuladas com cuidados especiais, pois arranhões invisíveis, impressões digitais, retenção de umidade, traços de substâncias previamente medidas ou de concentrações diferentes, podem estar presentes e absorver significativamente a luz. Uma boa prática é preencher a capacidade total das cubetas com água destilada e medir a absorção contra o branco, cujo valor é essencialmente zero.

1.5.1.3 Transdutor

Um transdutor é um sistema que transforma duas formas de energia para fins de medida. Ele mede uma forma de energia a qual está relacionada com a outra através de uma função conhecida, já o sensor é apenas a parte sensível do transdutor (WERNECK, 1996).

Segundo Fernandes (2005) um biossensor incorpora uma região de reconhecimento biológico denominada elemento bioseletivo ou biorreceptor, intimamente ligado a uma segunda região, o transdutor, capaz de converter um sinal em outro amplificado. São exemplos de elementos bioseletivos: enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, microorganismos, etc (VODINH, 2000).

O elemento bioseletivo interage com o analito e reconhece-o, gerando um sinal que pode ser absorção de luz, emissão de calor, mudança de estado de oxidação, etc. Já o transdutor é o elemento que possibilita o monitoramento da interação iniciada na região do elemento bioseletivo. Os NBAu são considerados transdutores intrínsecos, pois a transdução completa do sinal ocorre em associação com um transdutor extrínseco.

1.5.1.3.1 Sensores e suas tecnologias

Neste trabalho será abordado o sensor óptico de reconhecimento enzimático, os quais são altamente específicos, têm estabilidade conformacional considerável e podem ser reutilizados. Outras classes de sensores são os piezoeletrônicos, térmicos, eletroquímicos, sendo estes últimos comum em instrumentos para diagnóstico e laboratórios de análises clínicas. A detecção eletroquímica pode ser amperométrica (medindo-se a transferência de cargas) ou potenciométrica (medindo-se uma diferença de potencial) ou condutométrica (medindo-se mudanças na condutância entre os eletrodos) ou impedanciométrica (medindo-se mudanças de impedância no eletrodo) (FERNANDES, 2005). Aqueles amperométricos têm aplicação comercial expressiva devido à propriedade inerente de gerar um sinal proporcional à concentração do analito a partir do processo de transferência de carga. Os sensores amperométricos se classificam em três gerações, sendo: primeira, segunda e terceira geração (FREIRE, 2003).

Os sensores amperométricos de primeira geração baseiam-se na medição da concentração de oxigênio ou na concentração de peróxido de hidrogênio (LIU, 2001). Os de segunda geração utilizam mediadores na transferência de carga entre o centro ativo da enzima e a superfície do eletrodo (HENDRY, 1993). As duas primeiras gerações abriram caminho para a terceira geração de sensores, baseada na transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo. Comumente, são encontrados nos dispositivos eletrônicos para monitoramento de glicose os de segunda geração.

1.5.1.3.2 Fototransdutor

Existem diversos fototransdutores de efeito fotoelétrico (SKOOG, 2002), também conhecidos como fotodetectores (FERREIRA, 2003). Eles convertem a luz em sinal elétrico, proporcional ao número de fótons que colidem com a superfície fotossensível. Os mais comumente utilizados compreendem os tubos fotomultiplicadores (PMT) e os instrumentos mais antigos apresentam como fototransdutores as barreiras de camadas de células (também conhecidas como células fotovoltaicas) pois eram robustas e menos dispendiosas. Já os fotodiodos são fotodetectores que absorvem luz em uma faixa característica de λ (BURTIS *et al*, 2008).

As principais características dos fototransdutores para medidas espectrométricas correspondem a resposta na faixa espectral específica, trabalhar em baixa potência radiante, rapidez na resposta, produzir um sinal elétrico que possa ser amplificado e estabelecer uma função de transferência entre a potência radiante incidente e o sinal elétrico gerado.

1.5.1.3.2.1 Fotodiodo de semicondutor

Dispositivo também utilizado como fototransdutor, fabricado a partir de semicondutores fotossensíveis os quais geram corrente elétrica resultante da incidência de radiação na interface dos dois semicondutores. São sólidos, tais como silício, arsenieto de gálio, antimonídeo de índio, arsenieto de índio, seleneto de chumbo e sulfeto de chumbo (BURTIS *et al*, 2008). Possuem arranjos bidimensionais de diodos que podem tornar específica a resolução, por exemplo, existem arranjos concebidos para ter uma resolução de 2 nm, por diodo, entre 200 e 340 nm e resolução de 1nm por diodo, entre 340 e 800 nm.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do fotodiodo de semicondutor, pode ser integrado ao mesmo um pré-amplificador com FET (transistor de efeito de campo, do inglês, *field effect transistor*) sendo este detector de circuito híbrido, na prática, chamado de fotodiodo-FET (WERNECK, 1996). É importante destacar que as soldagens destes componentes é do tipo *SMD*, são as iniciais em inglês das palavras *Surface Mount Device*. Podemos encontrar siglas como *SMT* (*Surface Mount Technology*) ou *SMC* (*Surface Mount Component*). Todos estes termos têm significado semelhante e são relativos ao processo de montagem de superfície. A tecnologia *SMD* é um dos mais significantes eventos na eletrônica desde o surgimento do circuito integrado. O *SMD* é definido como o posicionamento e fixação de componentes eletricamente passivos ou ativos na superfície de uma placa de circuito impresso (PCI) ou mesmo em um substrato cerâmico. Esta tecnologia se difere do processo convencional o qual apresenta componentes com terminais e são inseridos através de furos na PCI, principalmente porque não há interferência mecânica em níveis similares ao sistema de corte e climpagem dos terminais. A climpagem no processo convencional é necessária para que os componentes não saiam de suas posições de montagem durante o manuseio e soldagem automática em máquina por onda.

1.5.1.3.2.2 Fototransistor

Semelhante ao fotodiodo de semicondutor, trata-se de um dispositivo que gera corrente elétrica com a incidência de luz. Entretanto, a corrente gerada é cerca de cem vezes maior do que o sinal de saída do fotodiodo. Associado a isso é bastante utilizado em conjunto com LED,

como fonte de luz, pois agrega características favoráveis de ganho e sensibilidade. Um exemplo é o fototransistor com junção do tipo NPN, o qual apresenta resposta rápida e alta sensibilidade a luz. Dentre suas características elétricas importantes está a resposta relativa *versus* λ , relação entre tensão de base no coletor-emissor *versus* corrente no coletor. Será considerado para este trabalho e representa um transdutor de sinal, já que é responsável por converter sinal óptico em sinal elétrico.

1.5.1.3.3 Sinal elétrico

Um sinal elétrico é a representação de uma variável física que foi medida ou monitorada por um transdutor. O sinal varia de acordo com esta variável física (WERNECK, 1996). Por sua própria natureza, os sinais são analógicos, isso significa que, a cada instante de tempo, é possível obter uma informação do sinal representada por uma função contínua, e não pode ser tratado adequadamente por um processador digital. Obtém-se do sinal analógico uma sequência de amostras, que representarão um sinal. Já o sinal discreto existe apenas por um instante específico de tempo, podendo ser armazenado e processado digitalmente (NALON, 2009). Esse processo é chamado de amostragem, ao realizar a conversão analógico-digital (A/D) e reconstruir o sinal digital-analógico (D/A), como mostra a Figura 16.

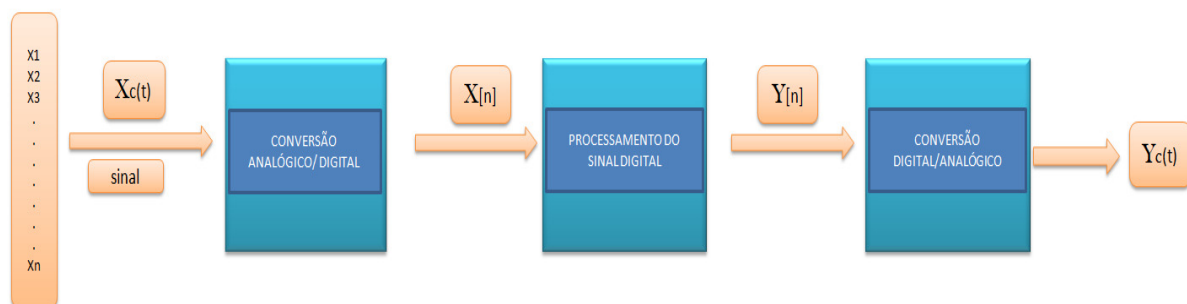


Figura 16 – Processamento digital de sinais analógico. $X_c(t)$ = sinal contínuo original, n = variável do tempo discreto, $X[n]$ = sinal discreto, $Y[n]$ = sinal processado e $Y_c(t)$ = sinal contínuo reconstruído. Adaptada de NALON (2009).

As amostras de um sinal não podem ser representadas com precisão ilimitada, pois um processador pode lidar apenas com números inteiros. Assim, cada amostra precisa ser quantizada, ou discretizada em amplitude para poder ser armazenada. Sinais que são discretos tanto no tempo como na amplitude são chamados de digitais, com incrementos de *bit* em *bit*. A

representação binária pode ser dada em sinal convertido de A/D ou simplesmente ADC, por exemplo, para 14 *bits*, 2^{14} corresponde a 16384 eventos inteiros (WERNECK, 1996).

1.5.1.3.4 Dispositivo de leitura

A forma de energia captada pelo transdutor é exibida em um medidor ou sistema de leitura. Os antigos dispositivos que realizam esta tarefa são analógicos e estão sendo substituídos por sistemas digitais em espectrofotômetros (BURTIS *et al*, 2008). Os registradores exibem o número relativo a absorção ou diretamente os valores de concentrações. A Figura 17 abaixo apresenta um diagrama de blocos do processo de leitura.

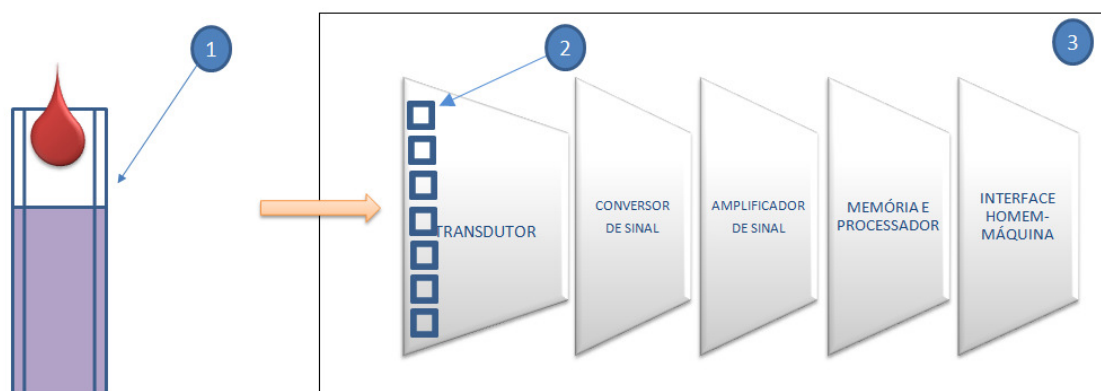


Figura 17 - Diagrama de blocos: 1- Sensor plasmônico ; 2- Sensibilização do fototransistor (transdutor extrínseco) pelo feixe de luz resultante da interação do feixe de luz incidente na amostra; 3- Elementos do sistema de aquisição de dados.

Na Figura 17, a etapa 1 representa moléculas do analito interagindo com o sensor plasmônico, armazenado na cubeta. Essa interação modifica o padrão do sinal de absorção e permite uma medida direta da concentração do analito. No fototransistor, considerado o transdutor extrínseco, representado nas etapas 2, a luz é convertida em sinal elétrico, seguindo-se da etapa 3 desde a conversão, amplificação, decodificação alfanumérica e registro na interface homem-máquina (IHM). Os dispositivos de leitura incorporados a fotômetros contam com microcontroladores os quais subtraem do branco os sinais digitais desconhecidos, calculando as concentrações automaticamente. Dados de múltiplos calibradores são freqüentemente utilizados para armazenar uma curva de calibração completa (BURTIS *et al*, 2008).

1.6 MEDIDAS DE *PERFORMANCE*

Propriedades eletrônicas significantes do fenômeno *LSPR* têm sido utilizadas em dispositivos de memória (OUYANG *et al*, 2004; LEONG *et al*, 2007), chaves moleculares (GITTINS *et al*, 2000) e atividade catalítica (EDWARDS; THOMAS, 2007; CHEN; GOODMAN, 2006; DANIEL; ASTRUC, 2004). Estas propriedades não são observadas nos macro-materiais e devem ser consideradas inovadoras para a construção, pesquisa e desenvolvimento de instrumentação. A engenharia de desenvolvimento sugere a montagem de uma arquitetura de instrumento que contemple o sistema de medição, a estruturação dos componentes e subsistemas desse produto e divisão em camadas. Esta última, apresenta uma divisão lógica onde cada camada representa um conjunto de componentes, com uma determinada responsabilidade e desacoplada ao máximo de componentes pertencentes a outra camada. Quando nos referimos ao desempenho ou *performance* de algum equipamento eletrônico, devemos seguir características aceitas universalmente, das quais as mais comuns são: faixa ou *range*, resolução, sensibilidade, linearidade, exatidão e precisão.

1.6.1 Faixa

Esta característica de equipamento representa todos os níveis de amplitude do sinal de entrada nos quais o transdutor opere. Também é conhecida como *range* (WERNECK, 1996) ou intervalo de medição analítica, e tem sido clinicamente importante destacar o limite de detecção (LoD), o qual equivale a menor concentração detectável de forma confiável.

1.6.2 Resolução

O menor incremento do sinal de entrada que pode ser mensurado é conhecido como resolução, representa a menor subdivisão da escala analógica ou, para sistemas digitais, a unidade para mais ou para menos do último algarismo significativo do valor medido. Este valor corresponde ao *bit* menos significativo do conversor A/D (WERNECK, 1996).

1.6.3 Sensibilidade

A sensibilidade é a relação matemática entre o estímulo de entrada do transdutor de sinal e o sinal de saída por ele produzido, representado por uma função de transferência (WERNECK, 1996).

1.6.4 Exatidão

Quando o equipamento faz uma leitura deve-se considerar os limites de escala para que o valor da medição seja válido. Logo, a medida da leitura deve cair dentro de uma *faixa* de trabalho estabelecida. A diferença absoluta entre o valor real e o valor padronizado para o equipamento chama-se exatidão ou erro, o qual pode ser representado em percentual de erro máximo, considerado para o instrumento.

1.6.5 Precisão

Os instrumentos e analisadores químicos possuem uma característica chamada de precisão, a qual define a capacidade de se obter o mesmo valor em diversas medidas. Pode também ser chamado de repetibilidade e representada pelo desvio padrão das medidas efetuadas (WERNECK, 1996).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver dispositivo eletrônico e sensor plasmônico para detecção de glicose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanobastões de ouro;
- Funcionalizar nanobastões de ouro com polieletrólitos: poliestireno sulfonato de sódio e poliacrilamida;
- Conjugar nanobastões de ouro funcionalizados com a enzima glicose oxidase;
- Estudar as contribuições da ressonância de *plasmon* de superfície (*LSPR*) para o desenvolvimento de um sensor plasmônico para detecção de glicose;
- Construir um dispositivo eletrônico, baseado em laser com um algoritmo computacional que permita fazer medidas e analisar a estabilidade do sinal elétrico registrado no transdutor, diante de soluções com diferentes concentrações de glicose;
- Propor uma interface para o sistema de aquisição de dados;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE DO SENSOR PLASMÔNICO

3.1.1 Reagentes e equipamentos utilizados

A Glicose oxidase (GO, EC 1.1.3.4, 211 U mg⁻¹ de *Aspergillus niger*); a D-(+)-glicose (99,5%); o sal de ouro (tetracloroaurato(III) de hidrogênio, o H₂AuCl₄·3H₂O, 99,9%); o L-ácido ascórbico (AA, 99%); o funcionalizador poliestirenosulfonato de sódio (PSS) e o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, 98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O polieletrólito poliácridamida catiônica (PAM, PolyFloc CP1154) foi adquirido da GE Water&Process Technologies. Foram preparados em laboratório, os demais reagentes: nitrato de prata (AgNO₃, 99,9%), tetraidroborato(III) de sódio (NaBH₄, 96%), água deionizada milli-q (millipore-quality, 18,18 μS/cm). Também se fez uso dos seguintes suprimentos e equipamentos: pHmetro e fitas de pH (0-14), cubetas de poliestireno de 10 mm de espessura (Ocean Optics, CVD-UV1S), *eppendorfs* (2 mL), termômetro (0-100°C), béquer (20, 50, 100 mL), micro-pipetas automáticas (5 μL, 10μL, 100μL, 1000 μL, 5000 μL), balança analítica (acurácia de 0,0002 g), agitador magnético Fisatom 752A (rotação nível 1 a 11 e barras magnéticas de agitação, centrífuga para *eppendorfs*, espectrofotômetro HR4000-CG-UV-NIR da Ocean Optics 200-1100nm, fonte de luz halógena DH-2000 da Ocean Optics e homogeneizador ultrasônico.

3.1.2 Métodos

As soluções das etapas de síntese foram preparadas com água deionizada milli-q e com pH controlado em 7,0, pois de forma semelhante ao constatado em quaisquer reações enzimáticas, as mudanças de pH podem afetar os resultados.

3.1.2.1 Síntese do colóide semente de ouro

Nesta etapa foi preparada a semente de ouro em meio aquoso, ou seja, uma solução de partículas anisotrópicas com tamanho aproximado de 4 nm (MURPHY *et al*, 2005; SAU, 2004). Para isso, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de CTAB (0,2 M) a 5 mL de

$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), seguida de 0,6 mL de solução resfriada de boroidreto NaBH_4 (10 mmol.L^{-1}) sob agitação vigorosa durante 2 min (barra magnética imersa na solução sob efeito do agitador magnético, em nível 8 de rotação). Esta reação resultou em solução coloidal a qual foi monitorada pela mudança de cor, inicialmente amarela, passando a marrom escuro que envelheceu durante 2 h, a fim de permitir a hidrólise de NaBH_4 que não reagiu. Assim originou-se a semente, que ficou disponível para iniciar a síntese de NBAu.

3.1.2.2 Síntese de nanobastões de ouro

A rota de síntese dos NBAu foi realizada através do crescimento por semente de ouro. Inicialmente ocorreu nucleação dos íons de Au que resultaram em nanopartículas. A presença de 0,2 mL do AgNO_3 reduziram 5 mL de HAuCl_4 ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), o qual estava em solução com 5 mL de CTAB (0,2 M). Após agitação suave (barra magnética imersa na solução sob efeito do agitador magnético posicionado no nível 5 de rotação), foi adicionado 0,1 mL de AA. A mistura foi agitada (barra magnética imersa na solução sob efeito do agitador magnético posicionado no nível 5 de rotação) e foram adicionados 0,02 mL de semente de ouro. Assim iniciou-se o crescimento dos nanobastões, durante 24 h.

3.1.2.3 Funcionalização dos nanobastões de ouro com polieletrólitos

Nesta etapa os nanobastões foram revestidos com camadas de polieletrólito aniônico PSS e catiônico PAM. Cerca de 10 mL de nanobastões preparados foram centrifugados duas vezes, a 13.000 rpm, durante 15 min por vez, o sobrenadante foi descartado e o precipitado disperso em 5 mL de água deionizada. Na sequência, foi adicionado, gota a gota, 200 μL de solução aquosa de PSS (2,5 mg/L), sob agitação suave (barra magnética imersa na solução sob efeito do agitador magnético posicionado no nível 5 de rotação). Após 1 h, foi centrifugado duas vezes a 13.000 rpm, durante 15 min por vez, a fim de remover qualquer excesso de PSS e disperso em 5 mL de água deionizada. Finalmente foi adicionado, gota a gota, 200 μL de solução aquosa de PAM (2 g/L). Após 1 h, centrifugou-se duas vezes, a 13.000 rpm, durante 15 min por vez, para remover o excesso de polieletrólito catiônico e redisperso em 5 mL de água deionizada.

3.1.2.4 Conjugação de nanobastões de ouro-PSS/PAM com GO

No presente trabalho foi utilizada GO comercializada pela Sigma Aldrich, oriunda do fungo *Aspergillus niger*. Um volume de 10 mL de nanobastões-PSS/PAM foi centrifugado a 13.000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi incubado, durante 1h, à 30°C, um volume de 2 mL de GO (5 mg/mL) previamente dissolvido em água deionizada. A mistura resultante foi centrifugada para eliminar GO livre. A GO imobilizada nos nanobastões-PSS/PAM compõe um novo sensor para glicose.

3.1.2.5 Preparação da solução de glicose e instruções para utilização

Partiu-se de uma solução-mãe glicosídica (D-(+)-glicose) em concentração de 300 g/L. As soluções-filhas foram preparadas por diluição e completando-se os volumes, por exemplo, para obtermos glicose em concentração 50 mg/dL. Inicialmente convertamos esta concentração para mg/mL, ou seja: 50 mg/dL $\Rightarrow$ 0,5 mg/mL. A conversão se fez necessária porque os glicosímetros portáteis disponíveis no mercado trabalham com esta unidade de concentração. Então multiplicamos este valor convertido pelo volume final da alíquota previamente padronizada de 3 mL, logo: 0,5 mg/mL x 3mL. Por fim dividimos o resultado deste produto pela concentração da solução-mãe, que é de 300 mg/mL, assim: (0,5 mg/mL x 3 mL) / 300 g/L = 5 μ L.

A seguir foi descrito o procedimento para utilização deste volume-controle:

1) Toma-se um volume da suspensão de NBAu-PSS/PAM/GO e completa-se até o volume padronizado de 3000 μ L (= 3 mL) com adição do volume-controle. Para o exemplo de 5 μ L, completamos com 2995 μ L, totalizando o volume-padrão de 3000 μ L a ser inserido na cubeta;

2) Fechar a cubeta;

3) Inverter a cubeta por duas vezes, em movimentos suaves de homogeneização;

4) Inserir a cubeta no porta-cubetas do *POCT*;

6) Ligar o sistema de leitura;

7) Fazer a leitura;

8) Repetir os passos 1-7 para as concentrações padronizadas (50, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 250 e 300 mg/dL).

3.1.2.6 Caracterização do sensor plasmônico

Espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis-NIR e as amostras acondicionadas em cubeta de quartzo de espessura 12,5 mm, excitadas com uma fonte de luz halógena pulsada do equipamento HR4000-CG-UV-NIR da Ocean Optics, interligado a um computador.

A morfologia dos NBAu foi obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET), modelo Morgagni 268D, do fabricante FEI, com aceleração de voltagem de 100 kV. O tratamento das imagens foi realizado com o software Image-Pro Plus 6 (Media Cybernetics). Para isso, foram centrifugados, a 12000 rpm, 5 mL de NBAu por duas vezes. O precipitado foi ressuspenso em 10 mL de água milli-Q. À grade de transmissão (Cu, 200 mesh) foram adicionados 10 mL da suspensão contendo o NBAu. Utilizou-se o teste “t” de Student concernente à comparação de medidas da razão de aspecto dos nanobastões. As diferenças foram consideradas significantes para níveis de confiança 95%. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (EPM).

3.2 DESCRIÇÃO DO DISPOSITIVO ELETRÔNICO DO TIPO *POCT*

3.2.1 Materiais e componentes eletrônicos

Um equipamento foi desenvolvido com arquitetura de hardware-software do tipo *POCT*. A Figura 18 traz a representação esquemática da fonte de luz, primeira unidade estrutural do *POCT*, entre as quais aplicou-se: 1) diodo emissor, trabalhando em faixa de comprimento de onda 850 nm; e 2) lasers semicondutores de ondas contínuas, trabalhando na faixa de comprimento de onda 650 nm e 780 nm. A segunda unidade estrutural é resultante de técnicas de engenharia molecular e síntese coloidal de um sensor plasmônico, estável, consumível em única dose. Funcionalizou-se a superfície dos NBAu, revestindo-os com polieletrólitos e em seguida conjugou-se com enzima GO em camadas, pelo método LBL. As camadas foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis-NIR e obteve-se uma relação qualitativa entre estas e seus respectivos espectros de LSPR. Para a terceira unidade estrutural foram selecionados transdutores de sinal, dentre eles: 1) diodo receptor, o qual trabalha na faixa de 700-900 nm, fixado por soldagem convencional; 2) diodo *Surface Mount Device*

(*SMD*), soldado em placa receptora; e 3) fototransistor para transformar a potência radiante em corrente, a qual foi convertida em tensão com auxílio de um amplificador operacional. Os circuitos eletrônicos foram simulados, analogicamente, em plataforma (*proto board*) da marca Radioshack. As soldagens convencionais foram realizadas em estação de solda da marca Hikari, de 80W e a soldagem *SMD* foi realizada na estação de soldagem YA XUN 702 (Apêndice D).

Desenvolveu-se uma abordagem experimental que permitiu conectar os componentes e programá-los a fim de reproduzir respostas correspondentes àsquelas de analisadores convencionais. Um analisador de estabilidade dos sinais do ADC induzidos pelo *plasmon* foi implementado em linguagem C, com aplicação de algoritmo específico.

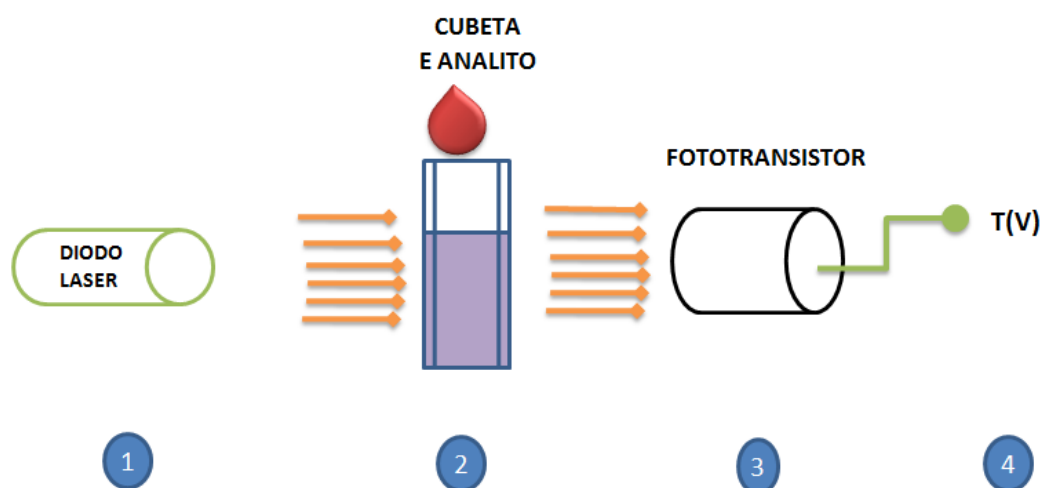


Figura 18 –Componentes do *POCT*. O item 1 representa a fonte de luz; o item 2 representa a célula de absorção, a qual mantém a amostra líquida na trajetória de um feixe de luz; o item 3 é o fototransistor como transdutor extrínseco. O sinal elétrico está representado no item 4.

A fim de avaliar o desempenho do instrumento proposto, a partir da comparação entre leituras de diferentes concentrações do analito, recorreu-se ao sistema portátil para monitorização da glicemia Accu-Chek® Active, do fabricante Roche.

3.2.2 Arquitetura do sistema de medição

O *POCT* apresentou-se através do conceito de “estrutura em camadas”, cada uma representando um conjunto de componentes que possuem uma determinada responsabilidade e que pretende estar desacoplado ao máximo de componentes pertencentes a outras camadas. Para esta estrutura utilizou-se um circuito eletrônico baseado em microcontrolador, ou seja,

um componente integrado que, em um único dispositivo, contém todos os circuitos necessários para realizar um sistema digital programável completo e microcontrolado. A configuração envolveu: a) um chip com via de programação de 32 bits; b) um conversor ADC de 14 bits, que permite uma resolução igual ao fundo de escala da amostra dividido por 2^{14} ; c) memórias de leitura programável; d) portas lógicas que puderam ser configuradas para aquisição de sinais; e) uma porta serial full duplex para comunicação com o processador de 32bits; f) um amplificador de ganho programável (do inglês *programmable gain amplifier*, *PGA*) que amplifica o sinal de tensão de saída do fototransistor; g) um processador de 8 bits, de baixa potência, que coordena os sensores e atuadores de baixo nível (laser, fototransistor, célula de Peltier), permitiu a utilização de periféricos de entrada e saída.

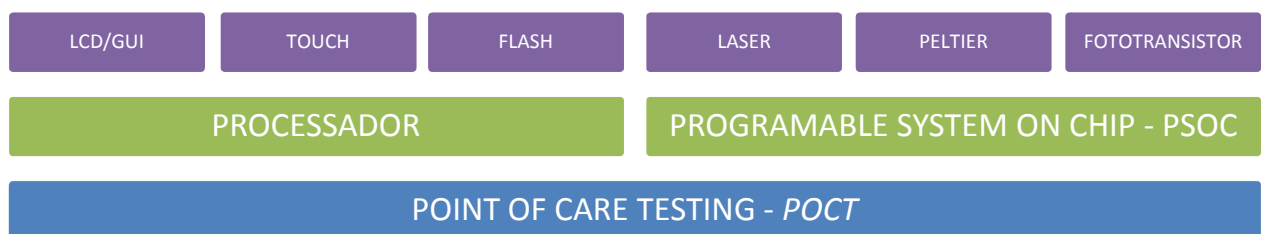


Figura 19 – Estrutura em camadas do *POCT*.

Na Figura 19, o primeiro nível foi denominado camada de hardware com sensores e conectores para entrada de dados do usuário e leitura das amostras, dentre os quais: uma tela colorida de *liquid crystal display (LCD)* e uma interface gráfica para o usuário *graphic user interface (GUI)*; um sensor resistivo de toque, do inglês *touch*, foi utilizado para implementar a entrada de dados do usuário, dizendo o que ele deseja fazer no *POCT*, ex.: pedido de leitura, gravação de dados e etc; uma memória *read-only memory (ROM) flash* foi disponibilizada para o armazenamento dos dados de leitura para futuras consultas; um laser com comprimento de onda especificado pela amostra é utilizado como referência para medir a absorção da amostra; um dissipador de calor, especificada pela célula de Peltier, controla a temperatura do laser mantendo sua intensidade constante; e ainda nesta primeira camada um fototransistor faz a leitura do feixe de laser, após atravessar a amostra, convertendo a intensidade em tensão elétrica.

O segundo nível foi denominado de camada de processamento de dados, dentre os quais: um processador de 32 bits e 100 MHz controla os eventos de pedido de entrada do *touch*, os eventos de saída da interface gráfica e do armazenamento de memória, a conversão

do valor de entrada do sensor para concentração e um sistema programável em chip fica a cargo da amplificação e conversão do sinal de tensão para um valor digital a ser processado. Por fim o último nível é a camada de aplicação, onde é agrupado o sistema de leitura de concentração de soluções de glicose com interface *Universal serial bus (USB)* e a alimentação pela mesma ou por bateria com um tamanho portátil e fácil de manusear. Na Figura 20 demonstram-se os protocolos de interligações que determinam como um programa do *POCT* deve preparar dados a serem enviados para o estágio seguinte do processo de comunicação. Os protocolos de comunicação aplicados foram: 1) I²C – é um protocolo de comunicação serial síncrona; 2) 232/TTL – é um formato de comunicação serial assíncrona; 3) Parallel – é a comunicação por porta paralela.

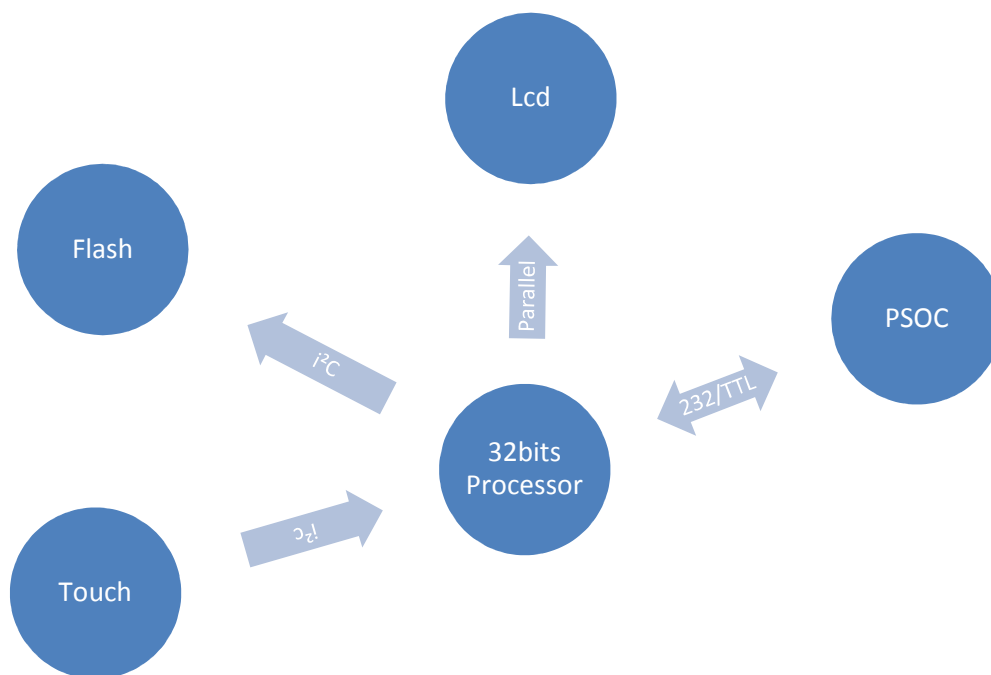


Figura 20 – Diagrama esquemático apresentando os subsistemas do primeiro nível (LCD, *Flash*, *Touch*) interligados com os subsistemas do segundo nível (Processador e Sistema programável no chip – PSOC). Os protocolos de comunicação estão evidenciados em cada conexão entre subsistemas.

3.2.3 Calibração e análise estatística

A calibração do *POCT* foi realizada com espectrofotômetro Ocean Optics, modelo HR4000-CG-UV-NIR. Para a análise estatística recorreu-se a: 1) regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados para obter o coeficiente de determinação R^2 e avaliar o nível de associação entre as variáveis dependentes estudadas; 2) Análise de Variância, utilizando o

teste-F com 95 % de confiança para ajuste do modelo linear; 3) O teste “t” foi utilizado para comparação entre dados e as diferenças foram consideradas significantes para níveis de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (EPM).

3.2.4 Parâmetros de desempenho do *POCT*

Medidas de estabilidade da fonte de luz foram realizadas monitorando-se a corrente gerada durante um período de 4 horas, com a radiação incidindo na cubeta vazia e também diretamente na fototransdutor. Foi plotada a função de calibração de trabalho, com o sinal medido para o analito nos três instrumentos ao nível de 95% de confiança estatística. Estimou-se o desvio-padrão entre os resultados dispersos por cada equipamento operado. Para isso realizaram-se 06 repetições autênticas de cada valor médio de concentração padrão. Fez-se a comparação entre medições com o POCT e os dois equipamentos comerciais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SENSOR PLASMÔNICO

Observou-se a morfologia dos NBAu com a técnica de formação de imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Este recurso foi de fundamental importância para estudos de geometria estrutural e determinação da distribuição de frequência da razão de aspecto dos NBAu. A Tabela 4 apresenta a faixa da razão de aspecto (comprimento/largura) das nanoestruturas obtidas e pode-se perceber a prevalência na faixa entre 2,9-3,0 (55%). A média de razão de aspecto, expressa como média $\pm$ EPM foi de $3,00 \pm 0,02$ ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Faixa da razão de aspecto (C=comprimento/ L=largura) dos NBAu e seu percentual de frequência nas faixas identificados nas imagens de MET.

Faixa da Razão de Aspecto (C/L)	% na Faixa	Unidades na Faixa Acumulativo
0,0-2,6	4	4
2,6-2,7	6	10
2,7-2,8	0	10
2,8-2,9	2	12
2,9-3,0	55	67
3,0-3,1	5	72
3,1-3,2	8	80
3,2-3,3	10	90
3,3-3,4	2	92
3,4-3,5	8	100
3,5-3,6	0	100

A Figura 21 mostra a imagem obtida no MET, a esquerda e são apresentados também, a direita, o histograma com a distribuição de frequência das faixas das razões de aspecto e o percentual de ocorrências observadas na faixa, por técnicas de contagem realizadas com o software Image-Pro Plus 6 e OriginPro 8.

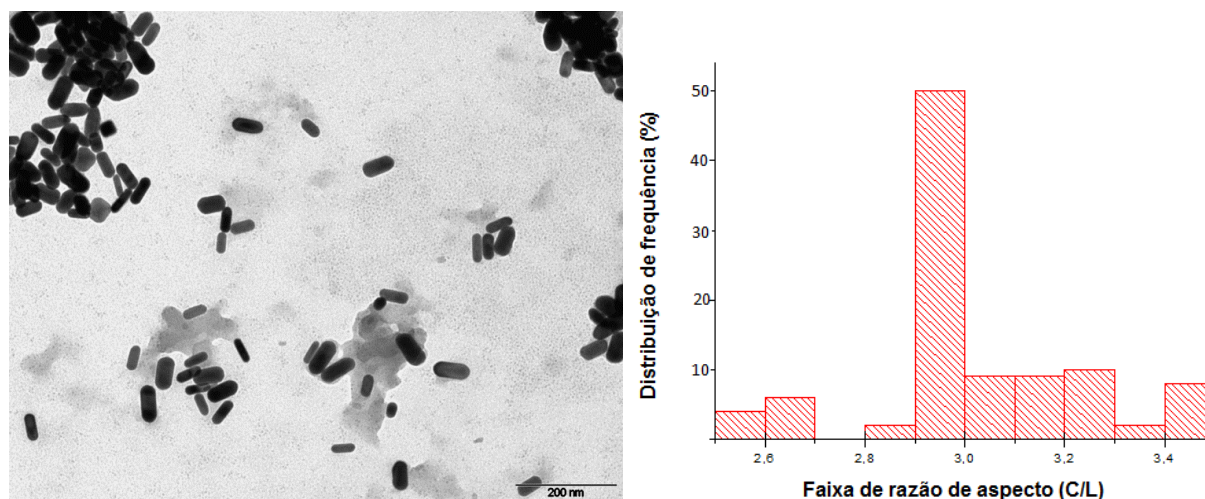


Figura 21 – Apresentação da morfologia (a esquerda) em formato de bastão, a partir de imagem MET. A direita, o histograma da distribuição de frequência da razão de aspecto e resultados extraídos da Tabela 4.

Os NBAu foram inicialmente revestidos com um surfactante CTAB, adquirindo carga positiva. Entretanto este produto possui alta citotoxicidade e promove a desnaturação de proteínas (CONNOR *et al*, 2005 ; MIRSKA *et al*, 2005). Para corrigir este efeito os NBAu revestidos foram tratados com o poliânion poliestirenosulfonato de sódio (PSS), resultando em camada com carga negativa. Em seguida, foi adsorvido um filme do policátion poliacrilamida (PAM). Em pH 7,0 a GO foi ligada aos NBAu recobertos com PAM. A Figura 22 traz um fluxograma detalhado destas etapas.

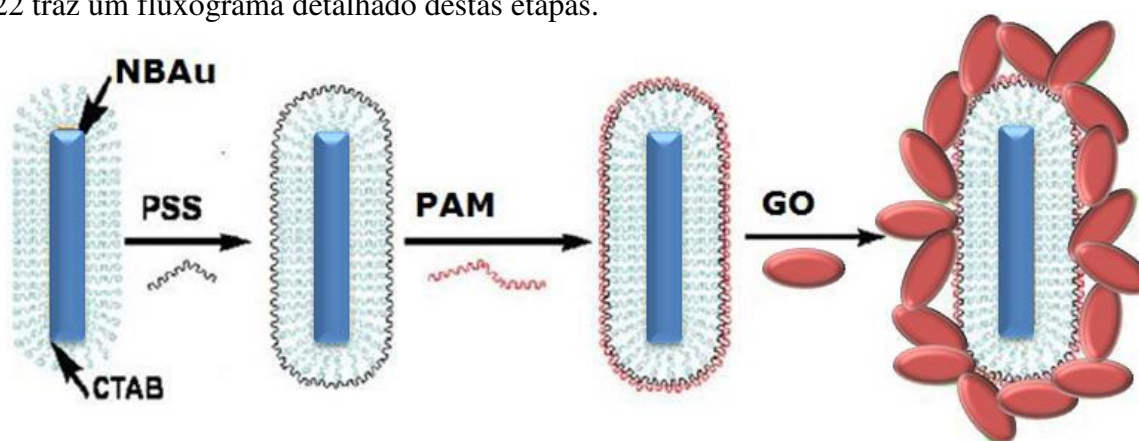


Figura 22 - Etapas de síntese. Fonte: Adaptada de ZHANFANG E DING (2009).

A síntese das NBAu foi confirmada por micrografia de MET e por espectroscopia de UV-Vis-NIR gerando picos de 550 nm para a ressonância de modo transversal e 744 nm para a ressonância de modo longitudinal. Na Figura 23, o *plasmon* longitudinal está relacionado à

NBAu sem funcionalizador e com o funcionalizador PSS, também se conhece o aspecto da solução de NBAu cobertos com este polieletrólito.

A partir do estudo de diferentes concentrações, foi possível comparar os resultados dos nanobastões sintetizados com o funcionalizador e entender a estabilidade da nanoestrutura. Foi avaliada a influência de diferentes concentrações do PSS, onde seu excesso gerou precipitação nos NBAu. Então, foi selecionada a maior concentração do PSS sem que gerasse precipitação, fator importante devido a formação de mais sítios ativos. Na Figura 24 percebe-se que os *plasmon* dos volumes de PSS, 100 μL e 200 μL , se sobrepõem, entretanto o volume 200 μL favorece a formação da monocamada.

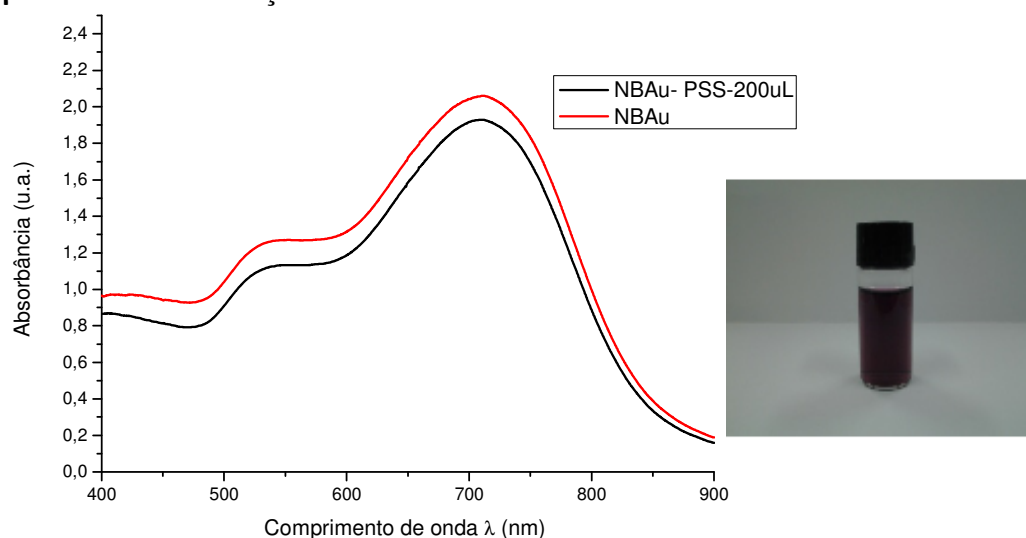


Figura 23 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu e no detalhe da imagem (a direita) uma suspensão de NBAu funcionalizados com PSS a 200 μL .

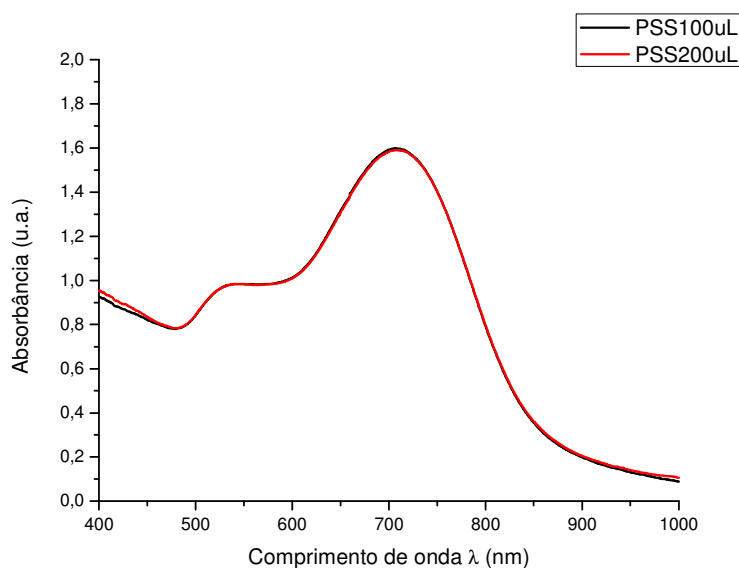


Figura 24 - Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu funcionalizado com PSS a 100 μL e 200 μL .

Segundo ZHANFANG e DING (2009) é conhecido que proteínas podem ser consideradas como tensioativos aniônicos simplesmente ajustando o valor do pH da solução. Para valores de pH maiores que 4,2 a enzima glicose oxidase forma uma monocamada como polieletrólito aniônico (O'MALLEY; WEAVER, 1972; SUN *et al*, 2001; XIN *et al*, 2003). Esta propriedade permite que a GO conjugue com NBAu recobertos com PAM por interações eletrostáticas. Pode-se conhecer no detalhe da Figura 25 os aspectos das soluções de NBAu em suas etapas: PSS, PAM e GO.

Os espectros UV-Vis-NIR dos NBAu mostrados na Figura 25 indicam uma redução na absorção conforme aumente o número de camadas. Para o NBAu/PSS, há um pico *LSPR* em 744 nm e uma absorção de 2,005 (Figura 25, curva verde). Comparando com o pico *LSPR* dos NBAu/PSS existe um espaço para o pico da camada NBAu/PSS/PAM, em 744 nm e uma absorção de 1,996 (Figura 25A, curva preta). A conjugação da GO ocorre com absorção em 1,921 (744 nm, curva vermelha), mostrando que os polieletrólitos foram sucessivamente adsorvidos sobre a NBAu através de interações eletrostáticas.

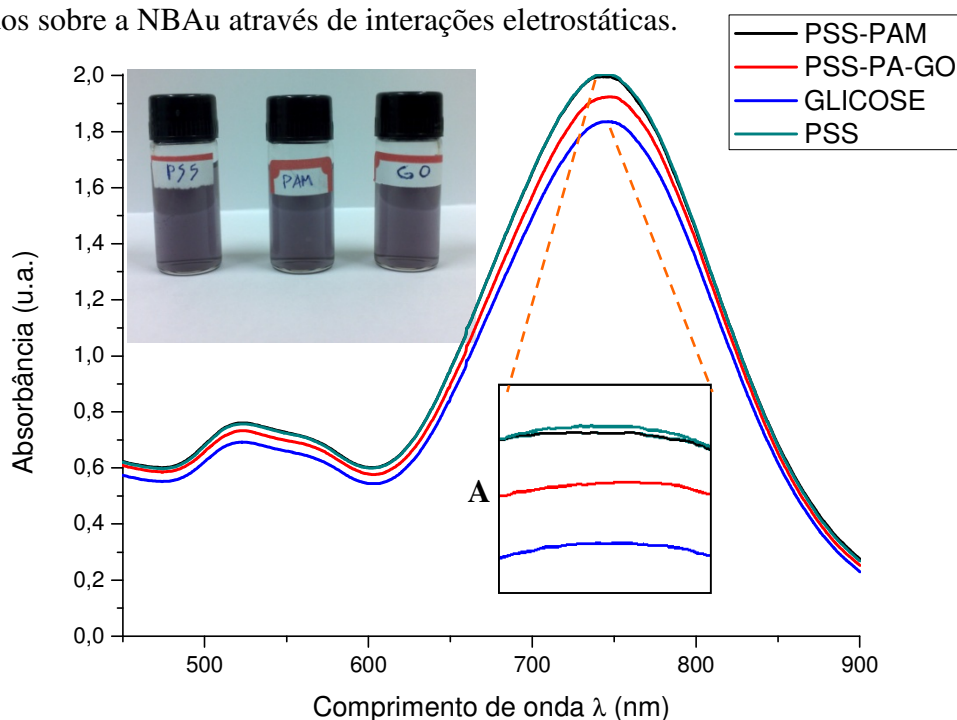


Figura 25 – Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu/PSS a 200 μ L (curva verde); NBAu/PSS/PAM (curva preta); NBAu/PSS/PAM/GO (curva vermelha) e reconhecimento da Glicose pelo sensor (curva azul).

NBAu conjugados com GO reconheceram uma solução de glicose, a qual apresentou absorção de 1,835 (Figura 25, a 744 nm, curva azul). Esse resultado mostra que o sensor plasmônico é sensível a presença de glicose, com variação de absorção 5% a menor. Na

Figura 25 fica evidente que o sensor para detecção de glicose foi resistente ao efeito de substâncias interferentes, uma vez que a enzima é muito específica para a glicose.

O espectro da Figura 26 foi a base para a calibração do sistema proposto. Percebe-se o fenômeno de redução na ordem de grandeza das absorções, sendo estas menores do que aquelas da Figura 25. Este comportamento é provavelmente devido a efeitos quânticos relacionados a mudança da razão de aspecto. A diferença no ângulo de polarização, a elongação elipsoidal e a presença de outras formas de nanoestruturas pode provocar esta alteração nas intensidades dos picos de *LSPR* a cada síntese (QIAOLING; YAHONG, 2012 *apud* YALÇIN, 2012). Entretanto permanece uma forte absorção na região de comprimento de onda típico para NBAu, (700-800 nm), o máximo dentro da banda *plasmon* aplicada neste trabalho. Implementar a calibração contribui nas correções sobre este efeito quântico e conserva a relação de sinal ADC vs. concentração. Na Figura 26, o detalhe do lado direito representa um foco no pico de LSPR da banda longitudinal, a 730 nm, percebe-se que a absorção reduz inversamente ao aumento da concentração das soluções de glicose.

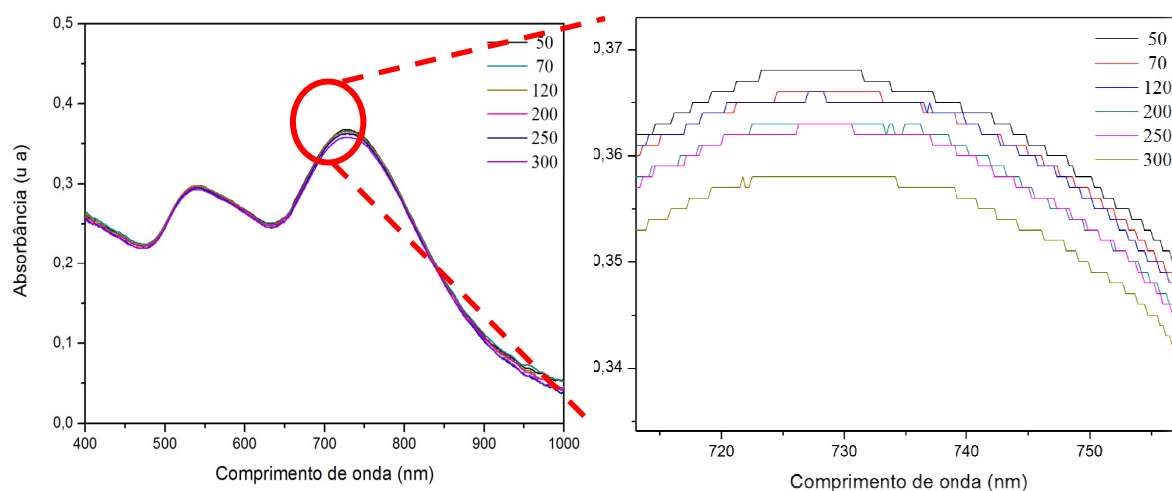


Figura 26 – Espectros de absorção UV-Vis-NIR para NBAu/PSS/PAM/GO em presença de concentrações diferentes de glicose (mg/dL). A direita, as curvas correspondentes a 50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL estão destacadas.

Espectros de absorção foram repetidos três vezes no calibrador HR 4000 da Ocean Optics e no glicosímetro Accu-Chek® Active da Roche, para cada concentração padrão de glicose já demonstradas na Figura 26. O maior desvio-padrão das amostras, considerando todos os instrumentos envolvidos foi de 0,57%, o que reflete a boa repetitividade dos sinais registrados.

Para a Tabela 5 os resultados foram aplicados a 95% de nível de confiança. Os valores críticos de t conforme o grau de liberdade em questão (n= 6) está disponível no Anexo 1. Não houve diferença significativa entre a variável de saída (ADC) do *POCT* quando comparada à variável de saída do HR 4000 (Absorção) ou quando comparada com a variável de saída do Accu-Chek® Active (concentrações de glicose pelo método potenciométrico/amperimétrico). Isso pode ser confirmado pela análise dos coeficientes de regressão linear encontrados na sequência de Figuras 27 até 29.

Tabela 5–Concentrações padrão de glicose e intervalos de confiança obtidos a partir de três repetições de cada variável dos equipamentos, aqui apresentadas com seus valores médios (n=6).

Concentração	Absorção (u.a.)	Concentração de glicose	ADC
Padrão de Glicose	HR 4000 (n=6)	Accu-Chek® Active mg/dL (n=6)	POCT (n=6)
50 mg/dL	0,3675 ± 0,002 ^a	16,3 ± 0,3 ^{a,b}	11590 ± 24 ^{a,b,c}
70mg/dL	0,3660 ± 0,002 ^a	18,6 ± 0,2 ^{a,b}	11428 ± 35 ^{a,b,c}
120mg/dL	0,3650 ± 0,002 ^a	110,2 ± 0,5 ^{a,b}	11272 ± 50 ^{a,b,c}
200mg/dL	0,3625 ± 0,002 ^a	182,1 ± 0,3 ^{a,b}	11200 ± 45 ^{a,b,c}
250mg/dL	0,3620 ± 0,002 ^a	201,3 ± 0,1 ^{a,b}	10920 ± 25 ^{a,b,c}
300mg/dL	0,3575 ± 0,003 ^a	220,3 ± 0,2 ^{a,b}	10780 ± 35 ^{a,b,c}

Médias seguidas de mesma letra, na horizontal, não diferem estatisticamente e os resultados são expressos como média ± EPM. ^a p < 0,05 vs. Concentração padrão de glicose (mg/dL). ^b p < 0,05 vs. HR 4000. ^c p < 0,05 vs. Accu-Chek® Active.

Na Figura 27 está explícita a função de calibração $y = (-3e-05)x + 0,369$, a correlação entre a concentração padrão de glicose e a absorção no HR 4000 forneceu um coeficiente de regressão linear 0,9301 e aponta um perfil linear para as concentrações das soluções a serem aplicadas como padrões de calibração. O mesmo comportamento linear pode ser observado na Figura 28 com coeficiente de regressão linear 0,9548, entre as concentrações padrão e o

POCT. Já entre as concentrações padrão de glicose e o glicosímetro portátil da Roche (foto no detalhe da Figura 29) a correlação foi de 0,9405.

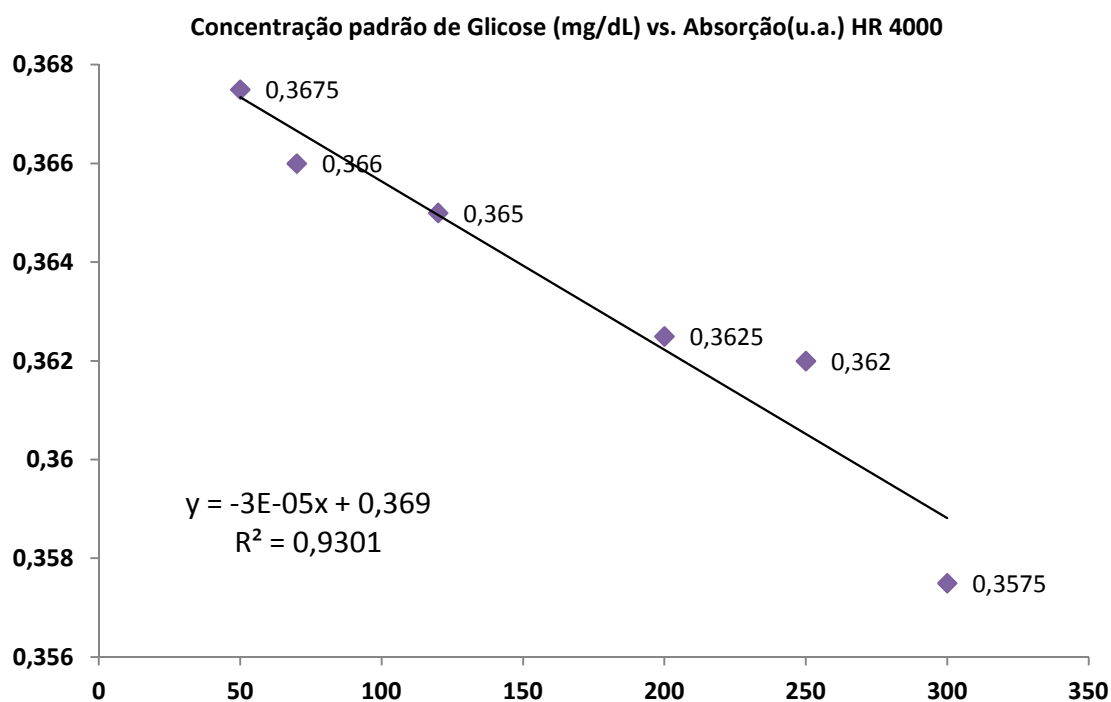


Figura 27 – Relação entre as concentrações padrão de glicose (50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL) e absorção (u.a.) do espectrofotômetro HR 4000.

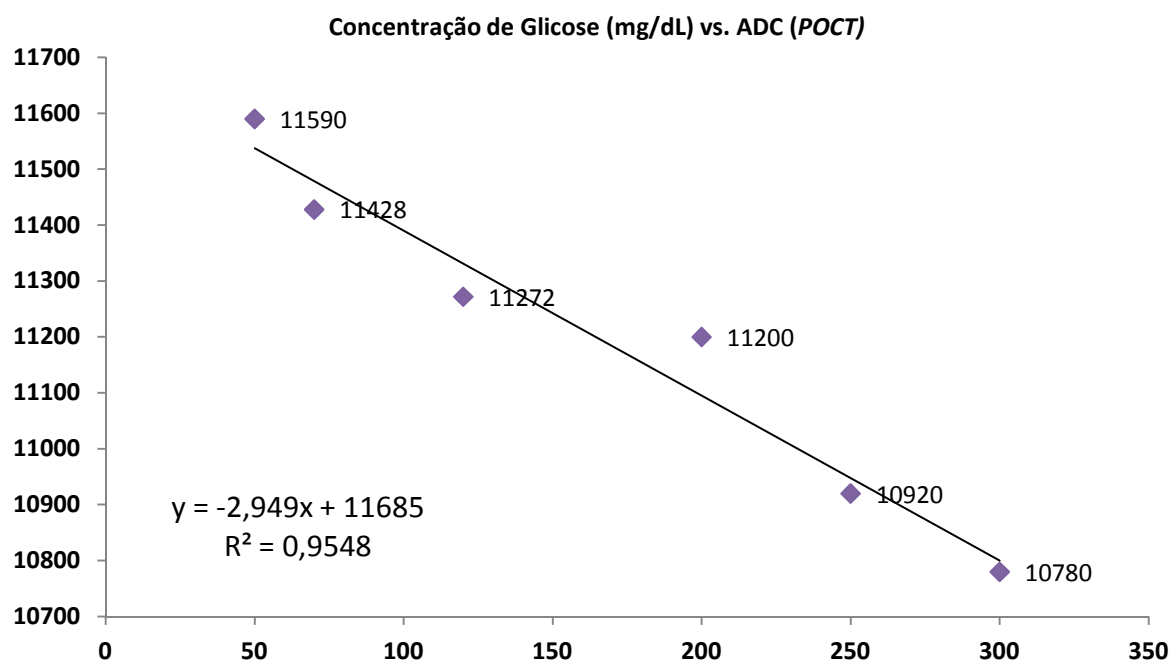


Figura 28 – Relação entre as concentrações padrão de glicose (50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL) e sinal digital ADC do *POCT*.

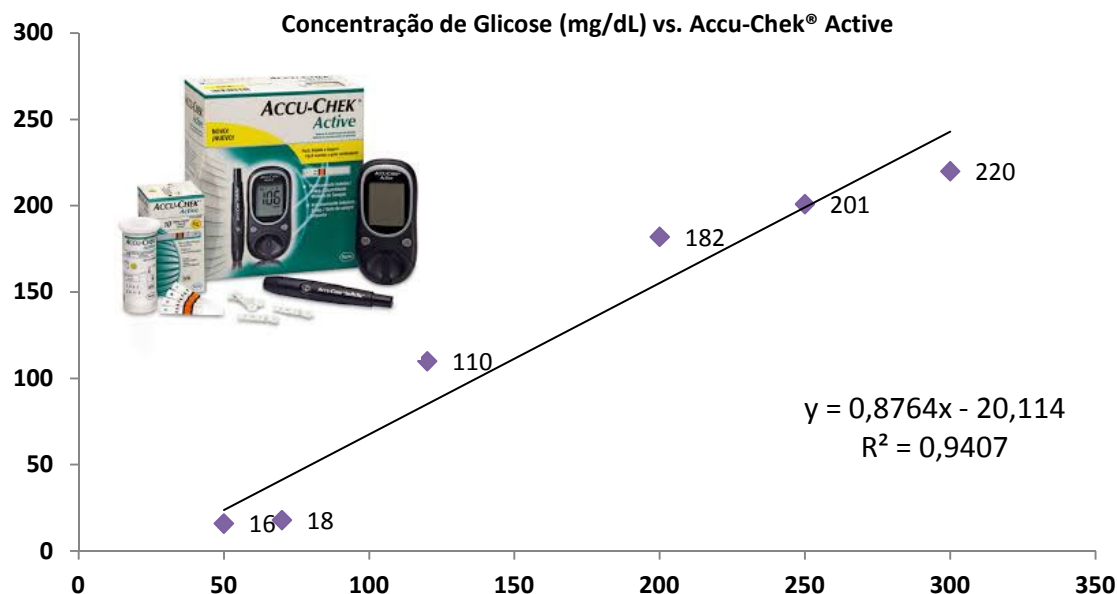


Figura 29 – Relação entre as concentrações padrão de glicose (50 mg/dL, 70 mg/dL, 120 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL e 300 mg/dL) e resposta do glicosímetro Accu-Chek® Active.

O valor do branco foi estimado para ADC de 980 ± 20 ($p < 0,05$) e sua linha de estabilidade pode ser apreciada no analisador cinético da Figura 44. Com o objetivo de comparar a precisão entre os dois grupos de dados analíticos, sinal ADC vs. Resposta do glicosímetro portátil Accu-Chek® Active utilizou-se o Teste-F. Para tanto, estabeleceu-se uma razão entre as variâncias dos dois grupos de dados e partiu-se da hipótese nula de que as variâncias das duas populações ou amostras estatísticas são iguais. Trabalhou-se com 12 graus de liberdade e análise de variância, o desvio-padrão (S_1) dos dados do dispositivo *POCT* foi 0,26 e o desvio-padrão (S_2) dos dados do glicosímetro portátil foi de 0,18. Logo para $S_1^2 > S_2^2$ e $F = S_1^2 / S_2^2$ para hipótese nula em $S_1^2 = S_2^2$ foi aceita para $F = 2,08 < 2,69$ (valor crítico de F em um nível de confiança de 95%) (ver Anexo 2), ou seja, as precisões são estatisticamente equivalentes.

Ao realizar a correlação de dados entre dispositivo eletrônico *POCT* e glicosímetro portátil da Roche, conforme Figura 30, obtivemos um coeficiente de regressão linear 0,8642 o qual aponta um perfil linear 4,906 % menor que o coeficiente observado na Figura 31 entre os dados do *POCT* vs. dados do espectrofotômetro de bancada HR 4000 cuja correlação foi de 0,9066.

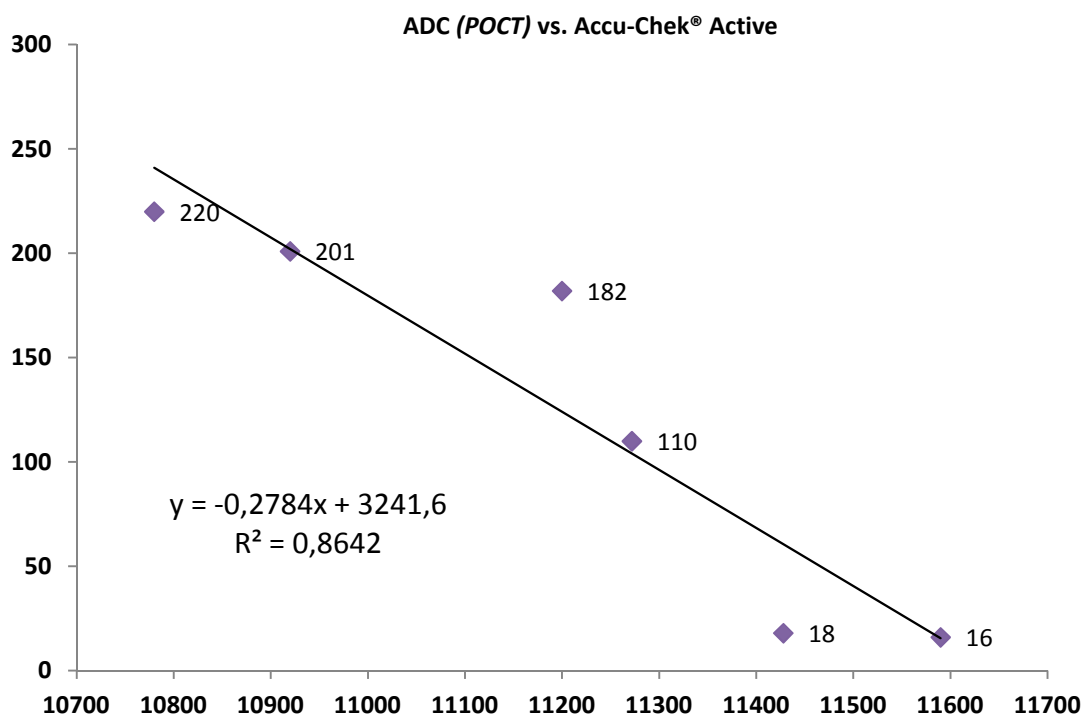


Figura 30 – Relação entre a resposta do glicosímetro Accu-Chek® Active vs. sinal ADC do dispositivo eletrônico *POCT*.

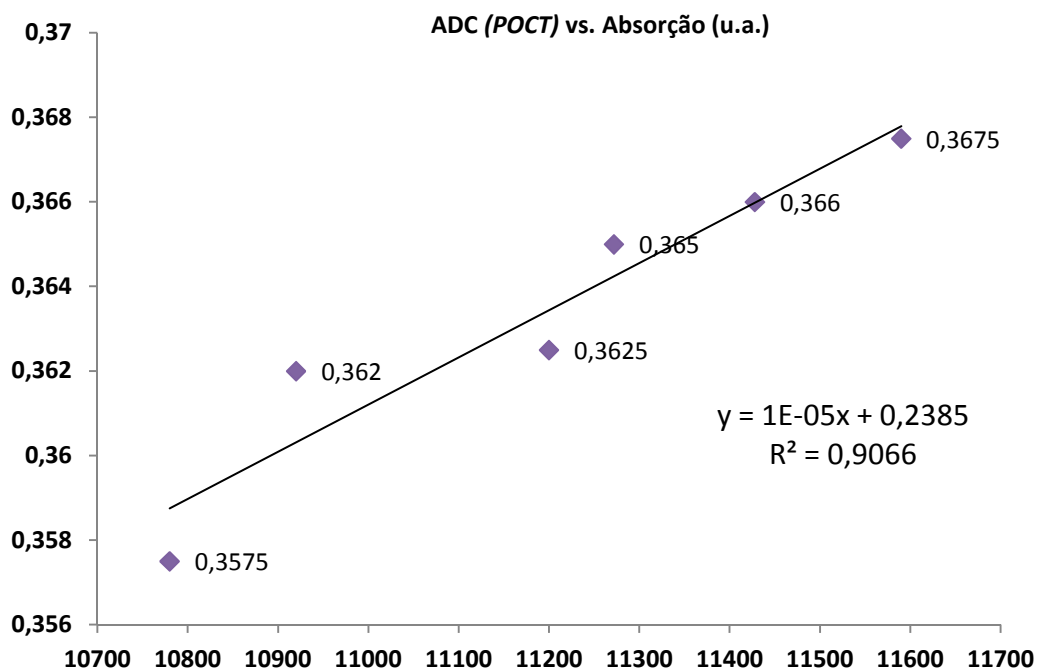


Figura 31 – Relação entre sinal ADC do dispositivo eletrônico *POCT* vs. Absorção (u.a) do HR 4000 da Ocean Optics.

4.2. FABRICAÇÃO DAS UNIDADES ESTRUTURAIS DO *POCT*

A fonte de luz foi montada, inicialmente, com diodo emissor em comprimento de onda 850 nm a partir do par diodo emissor - diodo receptor. Na Figura 32 é apresentado o PSOC, composto por uma placa microprocessada que possui todos os elementos de um computador: 1- entradas de sinais USB, serial, micro USB, nas laterais esquerda e direita da placa, 2-vários módulos de processamento inclusive um chip central onde foram programadas diversas tarefas e 3- display de cristal líquido. Esta placa foi o instrumento de prototipagem de baixo custo, para programar o chip do *POCT* em suas tarefas, comandos e rotinas.

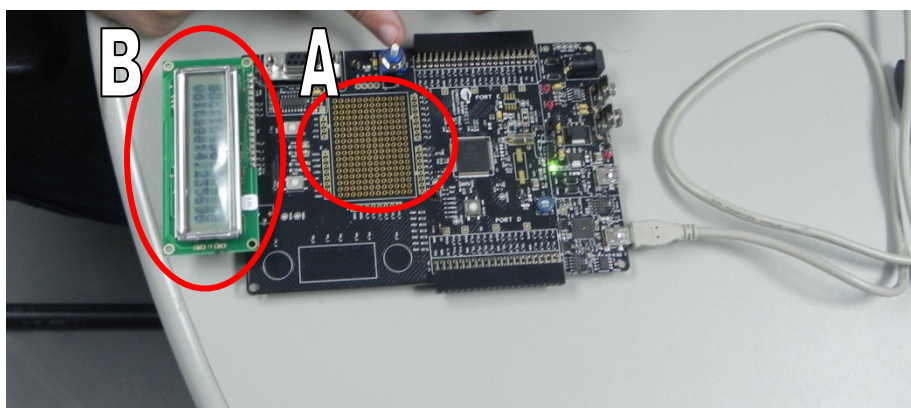


Figura 32 – *Programmable system-on-chip* (PSOC). No detalhe A-chip central e B-display de cristal líquido.

O PSOC foi ligado ao PC por um cabo USB e operou o protótipo do *POCT*, o qual montado sobre a plataforma (*protoboard*) observada no detalhe da Figura 33. Essa primeira versão consiste basicamente de uma fonte de radiação no infravermelho próximo, um sistema de detecção sensível ao infravermelho próximo (diodo receptor com faixa de comprimento de onda 700-900 nm , o qual é visto na Figura 33 em aspecto transparente logo em frente ao LED emissor de aspecto azulado), dois conjuntos de associação de resistores (para fornecer a tensão e corrente adequados ao emissor e ao detector) e finalmente um capacitor para reduzir ruídos elétricos no sistema. O conjunto citado pode ser entendido através do diagrama do circuito desenhado na Figura 33.

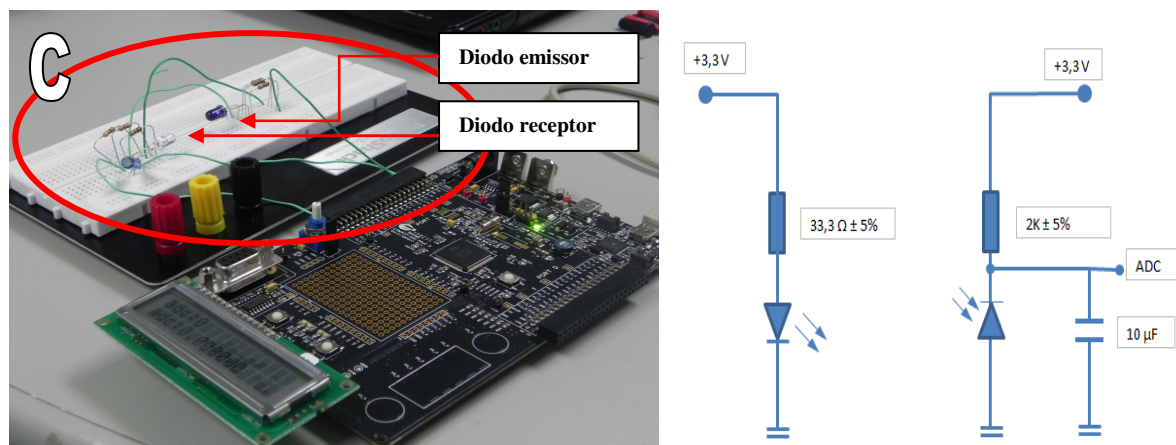


Figura 33 – PSOC ligado ao protótipo do sistema de leitura montado sobre a *protoboard* (detalhe C). A direita é apresentado o diagrama de circuito do POCT para o sistema emissor-receptor.

Com o caminho óptico livre de obstáculos, o sistema eletrônico exibiu sua primeira leitura entre o LED e o diodo receptor. Na Figura 34 pode ser visto o valor dessa leitura em $ADC=380$ e tensão $1,661\text{ V}$. Nesta etapa a resolução foi ajustada para 10 bits e a tensão de referência em $4,5\text{ V}$. As medidas de ADC apresentaram uma variação alta a cada registro em intervalos de 10 min durante 2 horas. Então estabilizou-se $ADC\ 373,3 \pm 3,1$ ($p<0,05$) após ajuste de resolução para 12 bits, tensão de referência em $3,3\text{ V}$ e ganho de tensão duas vezes maior, o que validou o protótipo de circuito e a funcionalidade do PSOC.

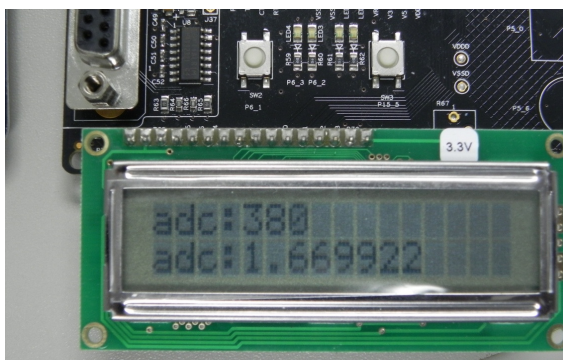


Figura 34 – Display de cristal líquido do PSOC registra em sua primeira linha, o sinal ADC e em sua segunda linha, seu respectivo sinal de tensão elétrica.

Testes foram realizados medindo a absorção em cubetas ainda vazias. A Figura 35 traz a decisão pela posição de menor caminho óptico, a fim de evitar reflexão do feixe nas quatro interfaces da cubeta (externa-interna na incidência do feixe de luz e nas interfaces interna-externa quando o feixe deixa a cubeta e segue para o detector). Um porta-amostra (*sample holder*) fixo no caminho óptico entre os dois diodos (emissor e receptor) foi proposto para manter a cubeta numa posição fixa para qualquer medida de calibração. Assim tivemos uma

posição padrão para todas as medidas. As medidas com cubeta vazia geraram um sinal ADC 360 ± 1 ($p < 0,05$).

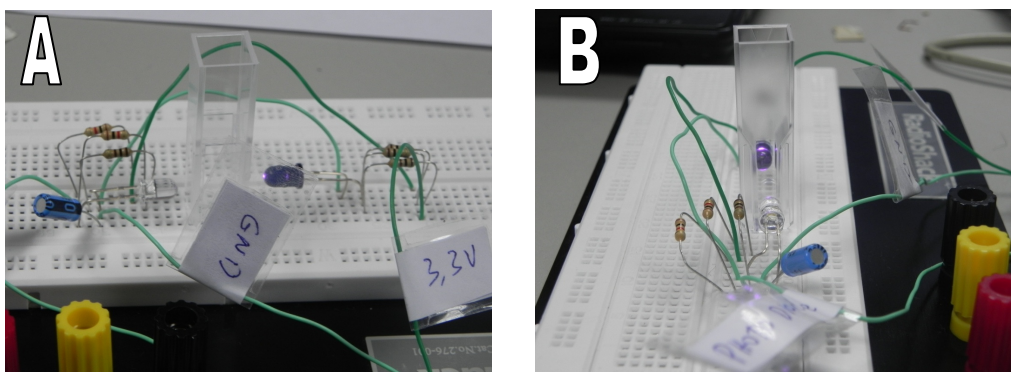


Figura 35 – Medidas de absorção com a cubeta vazia. O ângulo da imagem A permite observar o sinal oriundo do LED azul. A imagem B apresenta uma visão panorâmica do caminho óptico.

Medidas do valor da absorção são apresentadas na Figura 36. O ADC conferido no display aumenta, em módulo, para $405,02 \pm 0,5$ ($p < 0,05$) na imagem C. Isso ocorre porque o diodo detector funciona inversamente ao LED emissor (no sentido de elétrons e lacunas). Com a incidência de luz no detector, induz-se a recombinação de elétrons e lacunas na pastilha do semicondutor por isso a carga livre gerada no processo é menor e a tensão elétrica também.

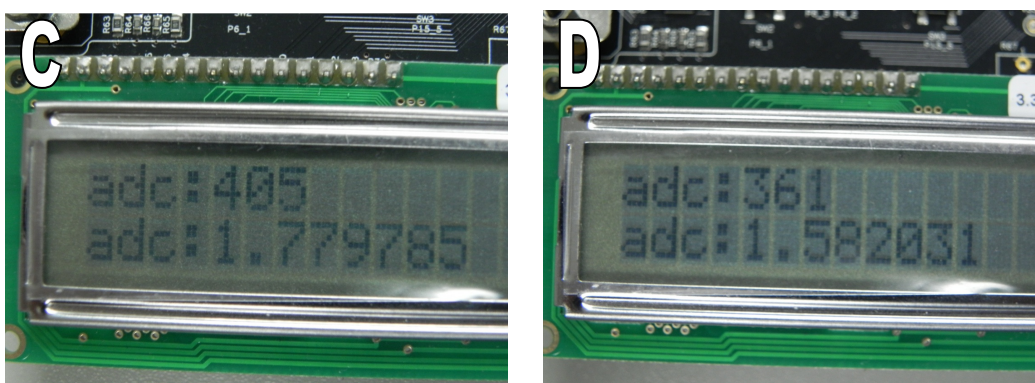


Figura 36 – Display do PSOC registra ADC com cubeta vazia na imagem C, o sinal ADC da imagem D representa cubeta com água.

A medida de absorção com a cubeta completada com água e o valor mostrado no display está no lado direito da Figura 36, valor $361,4 \pm 0,3$ ($p < 0,05$), desta vez é menor. Isso justificasse pelo fato de o líquido focalizar o feixe. Assim, uma maior densidade de luz chega no detector.

O sistema testado com o par diodo emissor-receptor apresentou um desvio-padrão de 0,59% constatando a estabilidade da fonte de luz testada com cubeta vazia, entretanto o sistema trabalha fora da faixa de absorção dos NBAu, de 650 nm, necessária a promover o efeito plasmônico. Na Figura 37 é apresentada a primeira versão (POCTV1) do dispositivo eletrônico POCT, com porta-cubeta e sistema emissor-receptor em soldagem convencional.

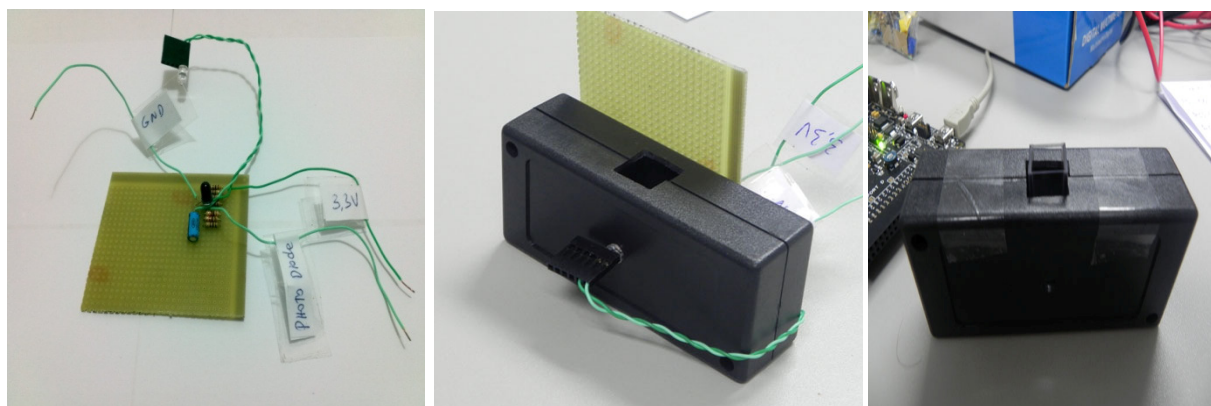


Figura 37 – Primeira versão (V1) do instrumento *POCT*. No centro o sistema montado na caixa. A esquerda temos o circuito emissor-receptor. A direita um detalhe do porta-cubeta.

O passo seguinte foi substituir o receptor por diodo *SMD* (fototransistor, 0-935 nm) soldado em placa receptora conforme Figura 38. O diodo emissor foi substituído por diodo *laser* de comprimento de onda 650 nm, o qual possui um feixe colimado que proporciona maior concentração de fótons. Novamente foi testado o comportamento do sinal ADC e configurou-se o ganho para 8 vezes e manteve-se a resolução em 12 bits. De toda forma passou-se a testar a absorção nos NBAu. Logo na primeira medida, o sistema registrou absorção excessiva (68%, $p < 0,05$) e decidiu-se por inverter a associação de resistores de forma a fornecer mais corrente ao LED emissor e consequentemente mais irradiância. Montou-se um novo porta-cubeta para a versão 2 (V2) (Figura 38), pois a caixa do POCTV1 comprometeu os resultados e gerou variações de leitura a cada toque na cubeta. Esta, não fica perfeitamente encaixada no orifício (Figura 37, a direita). Corrigiu-se imediatamente para garantir reprodutibilidade nas medições.

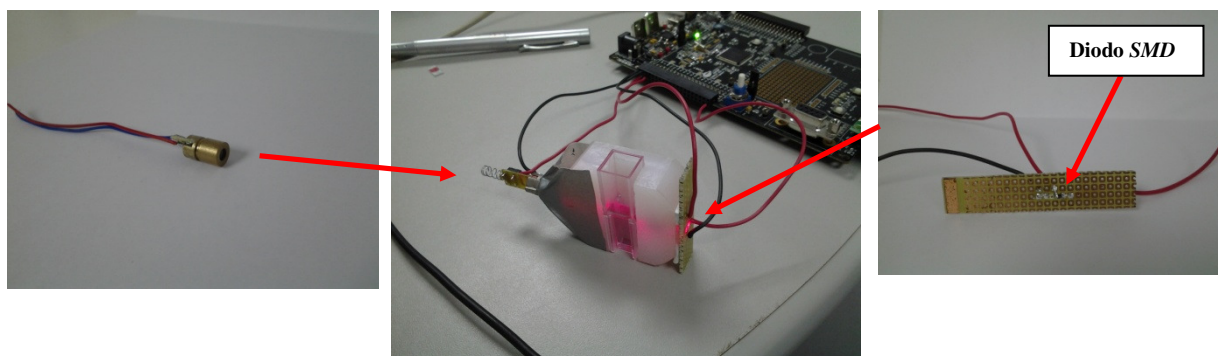


Figura 38 – POCTV2: Segunda versão (V2) do instrumento *POCT*. No centro pode-se perceber um novo sistema com porta-cubeta com orifício de passagem para o feixe *laser*, em nylon. A esquerda a nova fonte de luz com diodo *laser*. A direita um detalhe do diodo *SMD*(fototransistor).

Medidas em suspensão de NBAu recobertos com PSS foram realizadas no POCTV1. Como pode ser visto na Tabela 6, os valores não representam uma linearidade em função da concentração do PSS. Já as medidas com a nova fonte de luz foram mais estáveis e reprodutíveis e apresentaram uma relação linear com o volume de PSS.

Tabela 6 – Sinal ADC de NBAu recobertos por diferentes concentrações de PSS. As fontes de luz são diodo emissor a 850 nm e diodo *laser* a 650 nm.

	Diodo emissor (n=20)	Diodo <i>laser</i> (n=20)
PSS 1,0 mL, ADC	677,0 ± 0,6	420,0 ± 0,4 ^{a,b}
PSS 1,5 mL, ADC	296,0 ± 0,2	437,0 ± 0,5 ^{a,b}
PSS 2,5 mL, ADC	686,0 ± 0,7	460,0 ± 0,5 ^{a,b}

Médias seguidas de mesma letra, na vertical, diferem estatisticamente e os resultados são expressos como média ± EPM. ^a p < 0,05 vs. Diodo *laser* e na horizontal ^b p < 0,05 vs. Diodo emissor.

Durante os testes com diodo *laser* na versão POCTV2 foi implementada a tensão de *offset* a partir do sinal de ADC. Este processo pode ser entendido na Figura 39 onde o fototransistor apresenta um sistema de amplificação operacional e controle de saturação da corrente I_c . Assim uma faixa de trabalho pode ser estabelecida e realizou-se teste com o sensor plasmônico. O design do POCTV2 traz o *laser* como fonte de luz, um porta-cubeta em nylon com orifício (Figura 37) para passagem do *laser*, um display de cristal líquido, um chip programável em PSOC que pode ser visto na Figura 41. Este chip torna o dispositivo eletrônico independente do PC em comandos básicos como acionamento, comandos de leitura, registro do dado e armazenamento da informação. A programação é feita em linguagem C,

gravada no chip para em seguida ser conectada na placa do POCTV2 e esta instrumentação de gravação do chip está apresentada no Apêndice B.

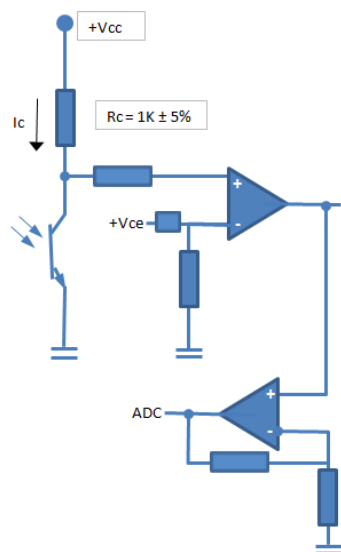


Figura 39 – Circuito eletrônico do fototransistor, apresenta um amplificador operacional e controle de saturação da corrente I_c .

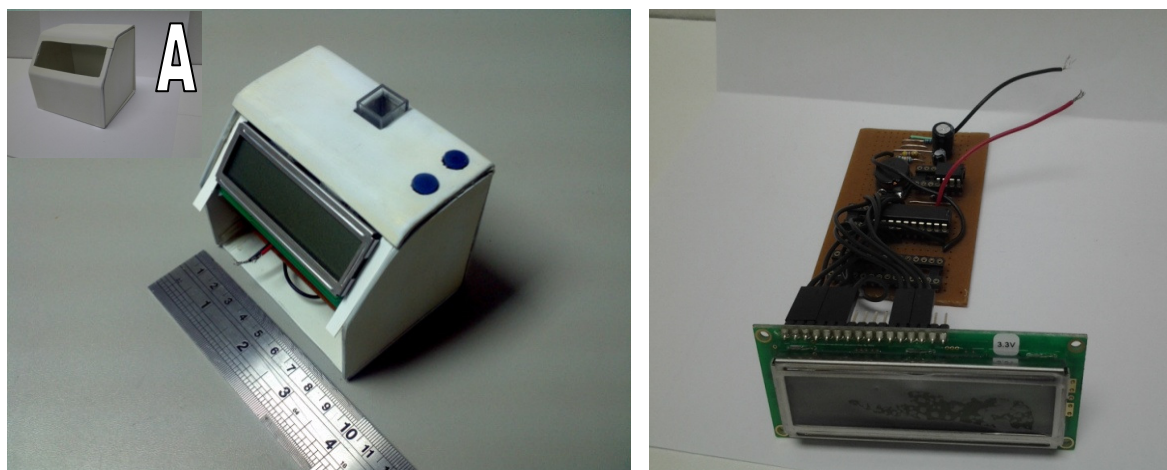


Figura 40 – O design do POCTV2 traz uma armação em PVC (no detalhe A do lado esquerdo). Internamente um circuito com o chip programável em PSOC e um display (lado direito da Figura).

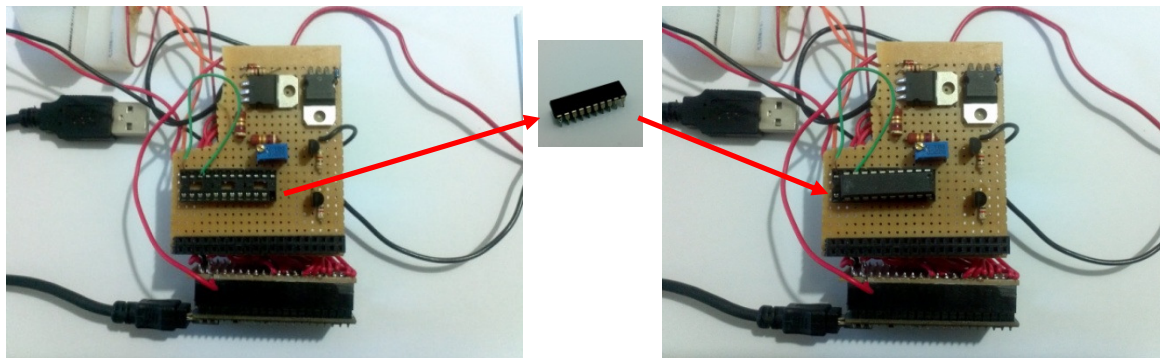


Figura 41 – No detalhe ao centro observa-se o chip, o qual já programado, conecta-se na placa do POCTV2.

Fez-se necessário o controle do aquecimento do *laser*, recorrendo-se a uma célula de Peltier, a qual funciona como circuito eletrônico de refrigeração do *laser* e instalou-se uma estrutura metálica na saída do *laser* com o objetivo de ajudar na refrigeração da emissão a fim de evitar as recorrentes distorções nas leituras por excesso de umidade na cubeta ou por aquecimento do próprio laser (Figura 42). O instrumento que antes possuía dimensões de 65 mm de comprimento, 85 mm de largura e 75 mm de altura foi reconfigurado para uma versão 3 (V3) e comporta a célula de Peltier e o novo sistema de registro de dados em tela *touchscreen*. O POCTV3 pode ser conferido no Apêndice E, onde é apresentado além do croqui, o equipamento desmontado, montado e em operação.

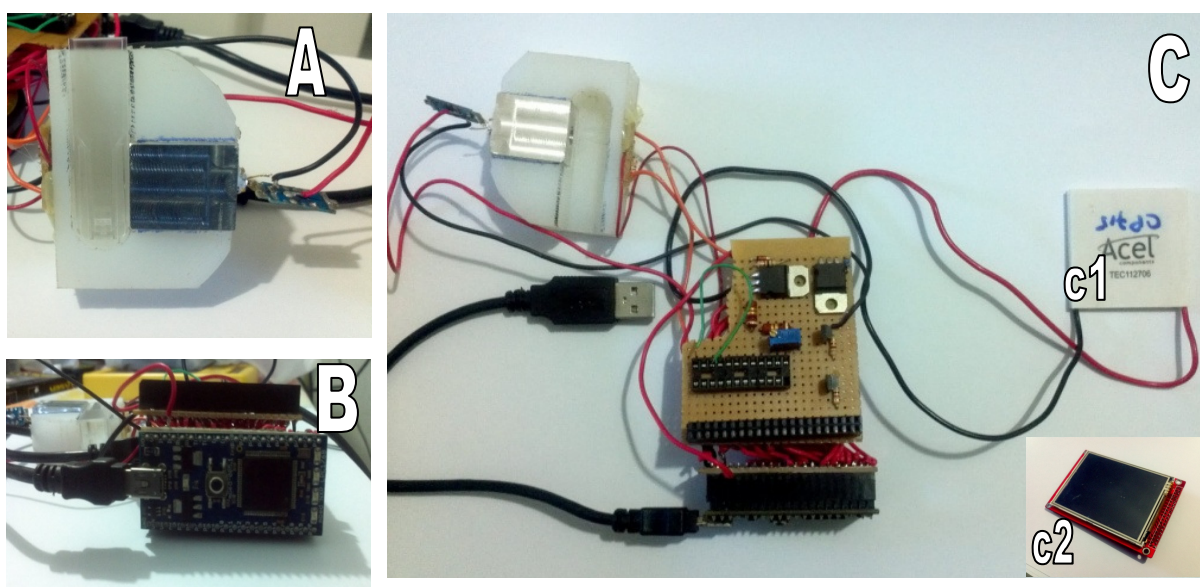


Figura 42 – Componentes internos do POCTV3. No detalhe A temos o sistema de refrigeração metálico, em B o controlador da tela *touchscreen* (detalhe C2) e em C o sistema montado com a célula de Peltier (detalhe C1) conectada ao circuito.

O circuito da Figura 39 representa uma base e uma distribuição de corrente e coletor. Temos a Resistência no coletor (R_c), a $V_{ce} = V_{cc} - I_c R_c$ que representa a equação da tensão no coletor-emissor (V_{ce}) e sua relação com a corrente de saturação (I_c), partindo de uma tensão de corte $V_{cc} = 3,3$ V. O *offset* permitiu transladar o sinal de tensão para um limite de tensão e amplificar o sinal sem perder característica de resposta e a tensão de saída do sinal digital é dada por $V_{adc} = V_{ce} \cdot (2^{14}) / (3,3)$. Para a versão POCTV3 o *laser* utilizado foi o arseneto de alumínio e gálio (GAAIAs) o qual funciona na faixa de 780 nm. O ajuste da potência de alimentação da fonte define a potência da luz emitida de 1 mW e representa um feixe monocromático e segue a lei de Lambert-Beer já enunciada na equação 1.2. A resposta

do fototransistor vem com a ocupação das lacunas da base por fótons emitidos pela fonte de luz, já a saturação será alcançada pelo preenchimento das lacunas por pares de elétrons gerados pela corrente de base. O cálculo da corrente de base é realizado a partir da definição da relação entre a eficiência do fototransistor e o comprimento de onda. O gráfico da Figura 43 representa o método de seleção da potência e parte da identificação do par coordenado de uma extremidade a outra da linha vermelha. Para este caso a corrente de saturação é de 3 mA e $V = 3,3$ V.

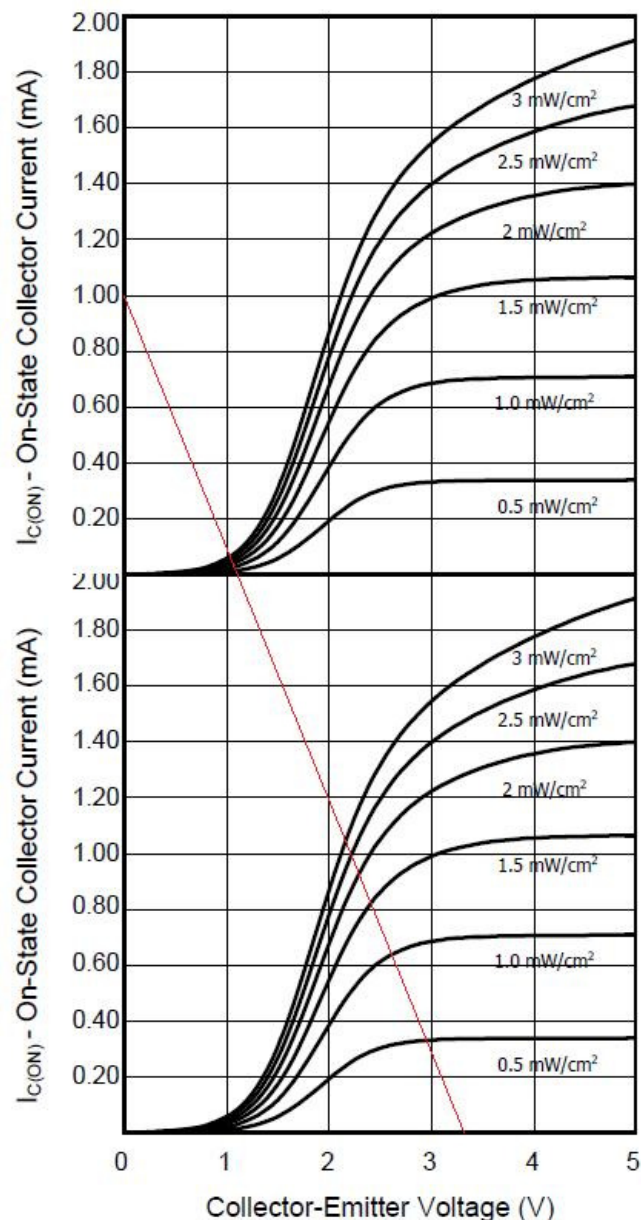


Figura 43 – Aproximação gráfica do par coordenado de uma extremidade a outra da linha vermelha, desde a corrente de 3 mA até tensão de 3,3 V.

É importante observar que para todas as versões a leitura é rápida e com tempo máximo de 4s.

4.3 ANALISADOR CINÉTICO

Para monitorar a absorção do sensor plasmônico foi desenvolvida e implementada outra rotina de software dentro do *POCTV3* aqui denominada de analisador cinético, o qual caracteriza as propriedades de qualidade na emissão pela fonte de luz e as propriedades de transdução do fototransistor. Com esta versão do equipamento é possível avaliar se os NBAu, ou mesmo outras nanoestruturas sofrem alterações estruturais ao longo do tempo em que estão em regime de leitura. Na Figura 44 podemos perceber que os patamares do sinal ADC da curva A e da curva B são de ordens de grandeza diferentes. Neste caso foi aumentado o volume de controle, de uma determinada concentração da plataforma sensora, de 1 mL (gráfico do lado esquerdo) para 2 mL (gráfico do lado direito).

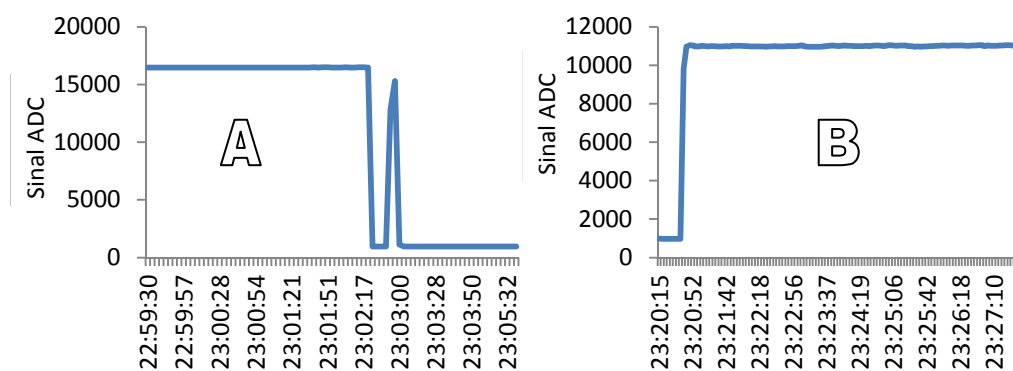


Figura 44 – Curvas obtidas da relação sinal digital ADC vs. tempo (s). Na curva A foi testado o volume de 1 mL do sensor plasmônico e na curva B, 2 mL.

Com o analisador pode-se acompanhar o efeito da retirada da amostra do porta-cubetas, representado pela pico de interrupção da curva A da Figura 44, bem como a linha do branco em ADC 980. Na Figura 45, abaixo, foi agrupado o resultado do sinal ADC monitorado por aproximadamente 30 min. Fica claro que existem patamares de controle capazes de ajudar em trabalhos com este tipo de tecnologia.

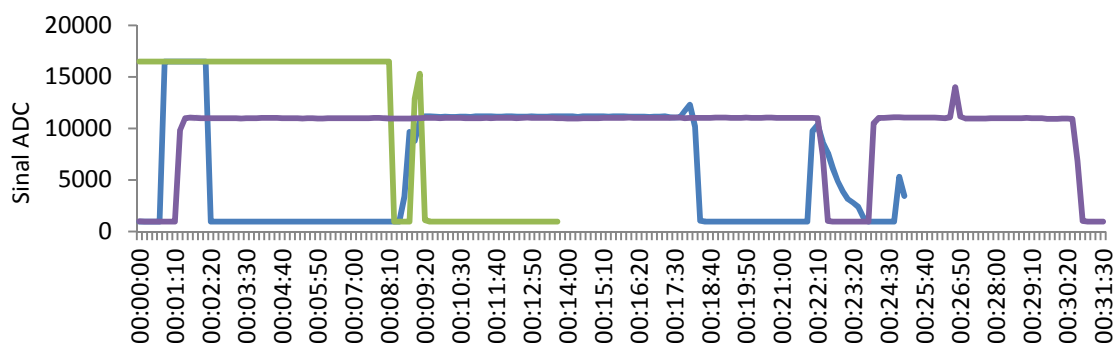


Figura 45 – Curvas de relação sinal digital ADC vs. tempo (s) para volumes de controle diferentes, 1mL (curva verde), 2 mL (curva roxa) e um teste de sensor plasmônico em presença do analito a 2 mL (curva azul).

Nessa perspectiva o Apêndice C apresenta o diagrama de blocos proposto para o analisador cinético. O bloco analógico consiste em um conversor digital, um regulador de tensão programável para polarização do fototransistor, um circuito de ganho (PGA), um contador e um circuito eletrônico de comunicação para interface com o usuário. Na Figura 46 abaixo uma tela demonstrando o perfil gráfico do analisador cinético.

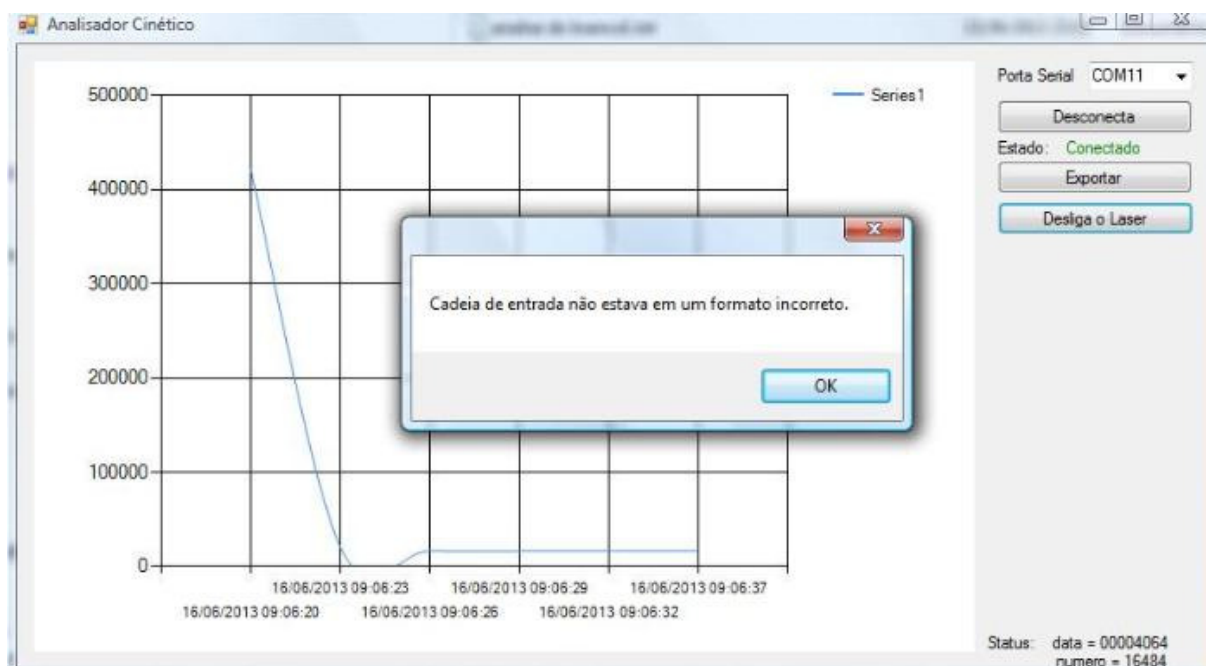


Figura 46 – Tela típica do POCTV3 selecionado no módulo de analisador cinético.

5 CONCLUSÕES

Através deste estudo foi possível obter NBAu com pico de absorção em 744 nm. Seguindo a rota descrita, as nanoestruturas tornaram-se susceptíveis a atuação de agentes surfactantes, funcionalização e posterior conjugação em base protéica. Além disso, foi possível quantificar o funcionalizador e associar suas propriedades ópticas às dos NBAu.

Demonstrou-se que a enzima GO pode ser automontada sobre polieletrólitos através de interações eletrostáticas, comprovando que sistemas com nanopartículas formam uma promissora matriz de imobilização de enzimas e proteínas para aplicações em plataformas nanosenssoras. O presente trabalho sugeriu uma inovação com a automontagem do polieletrólito PAM, de forma a aumentar a estabilidade da GO, sendo de grande importância na concepção de novos tipos de nanoreatores biocatalíticos e sensores plasmônicos partindo de outras nanoestruturas anisotrópicas.

O princípio de funcionamento deste sensor plasmônico resultou no desafio do desenvolvimento do dispositivo bioeletrônico *POCT*. Os testes deste conjunto comprovaram que podem ser utilizados NBAu funcionalizados para medidas quantitativas e qualitativas de biomoléculas como glicose e troponina I (citada no Anexo 5). A investigação do sistema emissor com aplicação do diodo *laser*, bem como a especificação do transdutor são etapas decisivas para o sucesso e estudos desta natureza. Os coeficientes de correlação investigados foram significativos e os resultados compatíveis aos espectrofotômetros comerciais.

Este instrumento desenvolvido faz parte de uma nova geração de dispositivos para análises espectrométricas e é necessária a continuidade aos trabalhos visando o aperfeiçoamento do sensor plasmônico e do dispositivo *POCT* em nível de doutorado, pois os ganhos potenciais para a sociedade serão incalculáveis em termos de diagnóstico rápido.

6 PERSPECTIVAS

- Encontrar correlação entre os picos longitudinais de *plasmon* vs. Razão de aspecto dos NBAu;
- Realizar medidas de espalhamento de raios X de baixo ângulo para acompanhar a formação das estruturas do sistema NBAu/PSS/PAM/GO) em cada etapa.
- Realizar medidas em amostras de sangue, soro e plasma utilizando o *Point of Care Testing*.
- Estabelecer um volume de controle a fim de dominar a estequiometria envolvida no sistema.
- Construir uma curva de calibração com dados suficientes para testes de linearidade, especificação da faixa de trabalho, LoD, LoQ e Resolução do *POCT*.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G. P.; DUTTA, N. **Semiconductor Lasers**. 2. Ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993.

ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WATSON, James D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.

ARIGA, K.; HILL, J. P.; JI, Q. *Layer-by-layer* assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 19, p. 2319-2340, 2007.

BORN, M.; WOLF, E. **Principles of Optics**. 7. ed. Oxford: Pergamon Press, 1998.

BUKASOV, R.; ALI, T.A.; NORDLANDER, P.; SHUMAKER-PARRY, J.S. Probing the plasmonic near-field of gold nanocrescent antennas. **ACS Nano**, v. 4, p. 6639-6650, 2010.

BURTIS, Carl A.; ASHWOOD, Edward R.; BRUNS, David E. **Tietz Fundamentos de química clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2008. 959p.

CHAN, G. H.; ZHAO, J.; SCHATZ, G.C.; VAN DUYNE, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular aluminum nanoparticles. **Journal Physical Chemistry-C**, v. 112, p. 13958–13963, 2008.

CHEN, M.; GOODMAN, D.W. Catalytically active gold: from nanoparticles to ultrathin films. **Acc. Chem. Res.**, v. 39, p. 739-746, 2006.

CHUN, M.W.; KWUN, H.W.; CHEN, X.D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 927-938, 2008.

CLEMENS B.; XIAOBO, C.; RADHA, N.; MOSTAFA A. EL-SAYED. Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1025-1102, 2005.

CONNOR, E.E.; MWAMUKA, J.; GOLE, A.; MURPHY, C.J.; WYATT, M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. **Small**, v. 1, n. 3, p. 325-327, 2005.

DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties and applications toward biology, catalysis and nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004.

DAVIS, J.; VAUGHAN, D.H.; CARDOSI, M.F. Elements of biosensor construction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 1030-1035, 1995.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.

DECHER, G.; HONG, J.D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin solid films**, v. 210-211, n. 2, p. 831-835, 1992.

DECHER, G.; SCHLENOFF, J. B. **Multilayer thin films**. Weinheim: Wiley-VCH, v. 42, 2003. 524 p.

DING, H.; YONG, K.T.; ROY, I.; PUDAVAR, H.E.; LAW, W.C.; BERGEY, E.J.; PRASAD, P.N. Gold nanorods coated with multilayer polyelectrolyte as contrast agents for multimodal imaging. **Journal Physical Chemistry-C**, v. 111, n. 34, p. 12552-12557, 2007.

EDWARDS, P.P.; THOMAS, J.M. Gold in a metallic divided state – from Faraday to present-day nanoscience. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 46, n. 29, p. 5480-5486, 2007.

FERNANDES, E.G.R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose**. Dissertação de Mestrado. Itajubá, MG: UNIFEI, 2005.

FERREIRA, M. **Óptica e fotônica**. 1. ed. Lisboa: Lidel –Edições Técnicas, 2003. 438p.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: na approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 230-243, 2003.

GALUSH, W.J.; SHELBY, S.A.; MULVIHILL, M.J.; TAO, A.; YANG, P.; GROVES, J.T. A nanocube plasmonic sensor for molecular binding on membrane surfaces. **Nano Letters**, v. 9, p. 2077-2082, 2009.

GEDDES, C.; LAKOWICZ, J. Topics in fluorescence spectroscopy. Radiative Decay Engineering. **Springer Science Buisness Media, inc**, New York, vol. 8, 2005.

GEOFFREY M. Cooper; HAUSMAN, R.E. **The cell: A molecular approach**. 4. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000.

GITTINS, D.I.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D.J.; NICHOLS, R.J. A nanometre-scale electronic switch consisting of a metal cluster and redox addressable groups. **Nature**, v. 408, p. 67-69, 2000.

GOLE, A.; MURPHY, C.J. "Polyelectrolyte-coated gold nanorods: synthesis, characterization and immobilization. **Chem. Mater**, v. 17, p. 1325-1330, 2005.

GUIOCHON, G.A.; BEAVER, L.A. Progress and future of instrumental analytical chemistry applied to the environment. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 524, p. 1-14, 2004.

HAES A.J.; CHANG L.; KLEIN W.L. Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor. **Journal American Chemistry Society**, v. 127, p. 2264-2271, 2005.

HAES, A.J.; VAN DUYNE, R.P. A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 379, p. 920-930, 2004.

HÄKKINEN, H. The gold-sulfur interface at the nanoscale. **Nature Chemistry**, v. 4, p. 443-455, 2012.

HALL, R. N.; FENNER, G. E.; KINGSLEY, J. D.; SOLTYS, T. J.; CARLSON, R. O. Coherent light emission from GaAs junctions. **Physical Review Letters**, v. 9, p. 366-368, 1962.

HENDRY, S.P.; CARDOSI, M.F.; TURNER, A.P.F.; NEUSE, E.W. Polyferrocenes as mediators in amperometric biosensors for glucose. **Na. Chim. Ac.**, v. 281, p. 453-59, 1993.

HERMANSON, G.T. **Bioconjugate technologies**. 2. ed. Illinois: Elsevier, 2008, 1202p.

HOLONYAK, N.; BEVACQUA, S. F. Coherent (visible) light emission from Ga(As_{1-x}P_x) junctions. **Applied Physics Letters**, v. 1, n. 4, p. 82-83, 1962.

HU, X.G.; CHENG, W.L.; WANG, T.; WANG, Y.L.; WANG, E.K.; DONG, S. Fabrication, characterization and application in SERS of self-assembled polyelectrolyte-gold nanorod multilayered films. **Journal Physical Chemistry-B**, v. 109, n. 41, p. 19385-19389, 2005.

HUANG, X.; EL-SAYED, I.H.; QIAN, W.; EL-SAYED, M.A. Cancer imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. **Journal American Chemical Society**, v. 128, n. 6, p. 2115-2120, 2006.

HUTTER, E.; FENDLER, J.H. Exploitation of Localized surface plasmon resonance. **Advanced Materials**, v. 16, n. 19, p. 1685-1706, 2004.

IPE, B.I.; THOMAS, K.G.; BARAZZOUK, S.; HOTCHANDANI, S.; KAMAT, P.V. Photoinduced charge separation in a fluorophore-gold nanoassembly. **Journal Physical Chemistry-B**, v. 106, p. 8-21, 2002.

ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular and Surface Forces**. 2. ed. New York: Academic Press, 1992.

JENNINGS, T.L.; SINGH, M.P.; STROUSE, G.F. Fluorescent lifetime quenching near d=1.5 nm gold nanoparticles: probing NSET validity. **Journal American Chemical Society**, v. 128, p. 5462-5467, 2006.

KAUSHIK, A.; KHAN, R.; SOLANKI, P. R. Iron oxide nanoparticles-chitosan composite based glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 4, p. 676-683, 2008.

KELLY, K.L.; CORONADO, E.; ZHAO, L.L.; SCHATZ, G.C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **Journal Physical Chemistry-B**, v. 107, p. 668-677, 2003.

KENNERLY, S.W.; LITTLE, J.W.; WARMACK, R.J.; FERRELL, T.L. Optical properties of heated Ag films. **Physical Review**, v. 29, n. 6, p. 2926-2929, 1984.

KIM, D.K.; PARK, T.J.; TAMIYA, E.; LEE, S.Y. Label-free detection of leptin antibody-antigen interaction by using *LSPR* -based optical biosensor. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, p. 4188-4193, 2011.

KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical Properties of Metal Clusters**. Berlin: Springer Series in Materials Science, v. 25, 1995.

LADAM, G. Protein interactions with polyelectrolyte multilayers: Interactions between human serum albumin and polystyrene sulfonate/polyallylamine multilayers. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 674-687, 2000.

LADAM, G. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. **Langmuir**, v. 17, n. 3, p. 878-882, 2001.

LADAM, G. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 2-6, p. 273-280, 2002.

LAL, S.; LINK, S.; HALAS, N.J. Nano-optics from sensing to waveguiding. **Nature Photonics**, v. 1, n. 11, p. 641-648, 2007.

LARSSON, E.M.; ALEGRET, J.; KALL, M.; SUTHERLAND, D.S. Sensing characteristics of NIR localized surface plasmon resonances in gold nanorings for application as ultrasensitive biosensors. **Nano Letters**, v. 5, p. 1256-1263, 2007.

LEE, B.; ROH, S.; PARK, J. Current status of micro-and nano-structured optical fiber sensors. **Opt. Fiber Technol.**, v. 15, p. 209-221, 2009.

LEE, K.S.; EL-SAYED, M.A. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging. **Journal Physical Chemistry-B**, v.110, p. 19220-19225, 2006.

LEONG, W.L.; LEE, P.S.; MHAISALKAR, S.G.; CHEN, T.P.; DODABALAPUR, A. Charging phenomena in pentacene-gold nanoparticle memory device. **Applied Physical Letters**.v. 90:042906, 2007.

LESKOVAC, V.; TRIVIC, S.; WOHLFAHRT, G.; KANDRAC, J.; PERICIN, D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 4, p. 731-750, 2005.

LI, C.; WU, C.; ZHENG, J. ; LAI, J. ; ZHANG, C. ; ZHAO, Y. *LSPR* sensing of molecular biothiols based on noncoupled gold nanorods. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 9130–9135, 2010.

LINK, S.; EL-SAYED, M. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. **Journal Physical Chemistry-B**, v. 103, p. 8410–8426, 1999.

LITTLE, J.W.; FERRELL, T.L.; CALLCOTT, T.A.; ARAKAWA, E.T. Radiative decay of surface plasmons on oblate spheroids. **Physical Review-B**, vol. 26, n. 10, p. 5953-5956, 1982.

LIU, J.; WANG, J. A novel improved design for the first-generation glucose biosensor. **Food Tec. Biotec.**, v. 39, n.1, p. 55-58, 2001.

LVOV, Y.; MÖHWALD, H. **In protein architecture: interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology**, New York: Marcel Dekker, 2000.

- MALZAHN, U. M. Driving diode lasers, is straightforward. **Europhotonics**, p. 22-23, 2004.
- MAXWELL, J.C. **A Treatise on Electricity and Magnetism**. Oxford, Clarendon Press, 1873.
- MCFARLAND, A.D.; VAN DUYNE, R.P. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. **Nano Letters**, v. 3, p. 1057-1062, 2003.
- MELLENDEZ, J.; CARR, R.; BARTHOLOMEW, D.U.; TANEJA, H.; YEE, S.; JUNG, C.; FURLONG, C. Development of a surface plasmon resonance sensor for commercial applications. **Sensors and Actuators-B**, v. 38-39, p. 375-379, 1997.
- MIE, G. Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. **Annalen der Physik**, v. 25, n. 3, p. 377-445, 1908.
- MIRSKA, D.; SCHIRMER, K.; FUNARI, S. S.; LANGNER, A.; DOBNER, B.; BREZESINSKI, G. Biophysical and biochemical properties of a binary lipid mixture for DNA transfection. **Colloids Surf B Interfaces**, v. 40, n. 1, p. 51-59, 2005.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica**. EDUCS, 1901. 332p.
- MURPHY, C.J.; SAU, T.K.; GOLE, A.M.; ORENDORFF, C.J.; GAO, J.; GOU, L.; HUNYADI, S.E.; LI, T. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. **Journal Physical Chemistry-B**, v. 109, p. 13857-13870, 2005.
- MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*. **Bioinorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation**, v. 10, n. 2, p. 177-184, 2006.
- NALON, J. A. **Introdução ao processamento digital de sinais**. 1. Ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2009. 216p.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1200p.
- OHDE, H.; WAI, C. M.; RODRIGUEZ, J. M.; The synthesis of polyacrylamide nanoparticles in supercritical carbon dioxide. **Colloid and Polymer Science**. v. 285, p. 475-478, 2007.
- O'MALLEY, J.J.; WEAVER, J.L. Subunit structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, **Biochemistry**, v.11, p. 3527, 1972.
- OUYANG, J.; CHU, C.W.; SZMANDA, C.R.; MA, L.; YANG, Y. Programmable polymer thin film and non-volatile memory device. **Nature Materials**, v. 3, p. 918-922, 2004.
- PETER, M.C.; LAKOWICZ, J.R. **Lamguir Blodgett: An introduction**. Cambridge: University Press, 1996.
- PINCHUK, A.; KREIBIG, U.; HILGER, A. Optical properties of metallic nanoparticles: influence of interface effects and interband transitions. **Surface Science**, p. 269-280, 2004.

- PRASAD, P.N. **Introduction to Biophotonics**. New York: Wiley-Interscience, 2003.
- PRASAD, P.N. **Nanophotonics**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2004.
- QIU, J.D.; WANG, R.; LIANG, R.P.; XIA, X.H. Electrochemically deposited nanocomposite film of CS-Fc/Au NPs/GOx for glucose biosensor application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2920-2925, 2009.
- ROBENSON, J.D. Nanotechnology and the USPTO. **National Association of Patent Practitioners**, 2006.
- ROSA, J.P.M. **Nanobiophotonics for biomolecular diagnostics**. Tese de Doutorado. Lisboa: FCT/UNL, 2013.
- ROTELLO, V. **Nanoparticles-Building Blocks for Nanotechnology**. New York: Springer Science Buisness Media, 2004.
- SAGIV, J. Organized monolayers by adsorption. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. **Journal American Chemical Society**, v. 102, n. 1, p. 92-98, 1980.
- SANTOS, J.C. de C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores**. Dissertação de Mestrado. São Carlos, SP: USP, 2012.
- SAU, T.K., MURPHY, C.J. Seeded High Yield Synthesis of Short Au Nanorods in Aqueous Solution. **Langmuir**, v.20, p. 6414-6420, 2004.
- SHACKELFORD, J.F. **Ciência dos Materiais**. 6. ed. São Paulo: Prentice Hall Brasil, 2008. 576p.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman Editora, 2002.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.
- SUN, J.; SUN, Y.; WANG, Z. Ionic self-assembly of glucose oxidase with polycation bearing Os complex. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 202, n. 1, p. 111-116, 2001.
- SUN, Y.; XIA, Y. Increased sensitivity of surface plasmon resonance of gold nanoshells compared to that of gold solid colloids in response to environmental changes. **Anal. Chem.**, v. 74, p. 5297-5305, 2002.
- SVEDENDAHL, M.; CHEN, S.; DMITRIEV, A.; KALL, M. Refractometric sensing using propagating versus localized surface plasmons. **Nano Letters**, v. 9, p. 4428-4433, 2009.
- TAERIN, C.; SEUNG-YEOL, L.; EUI YOUNG, S.; HONGGU, C; BYOUNGHO, L. Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing. **Sensors**. v. 11, p. 10907-10929, 2011.

TAN, Y.N.; SU, X.; ZHU, Y.; LEE, J.Y. Sensing of transcription factor through controlled-assembly of metal nanoparticles modified with segmented DNA elements. **ACS Nano**, v. 4, p. 5101-5110, 2010.

UNG, T. ; LIZ-MARZAN, L.M. ; MULVANEY, P. Colloids and Surfaces A: Physicochem. **Eng. Aspects**, v. 202, p. 119–126, 2002.

VAN GENT, J.; LAMBECK, P.V.; KREUWEL, H.J.M.; GERRITSMA, G.J.; SUDHÖLTER, E.J.R.; REINHOUDT, D.N.; POPMA, T.J.A. Optimization of a chemooptical surface plasmon resonance based sensor. **Applied Optics**, v. 29, n. 19, p. 2843-2849, 1990.

VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications**. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

VIEIRA, N.C.S. **Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de InO₃ : Sn**. Dissertação de Mestrado. Itajubá, MG: UNIFEI, 2006.

VILLALBA, P.; RAM, M. K.; GOMEZ, H.; KUMAR, A.; BHETHANABOTLA, V.; KUMAR, A. GOx-functionalized nanodiamond films for electrochemical biosensor. **Materials Science and Engineering-C**, v. 31, n. 5, p. 1115-1120, 2011.

VO-DINH, T.; CULLU, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 336, n. 6, p. 540-551, 2000.

WERNECK, Marcelo M. **Transdutores e Interfaces**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1996, 225p.

WILSON, R.T. Glucose oxidase: na ideal enzyme. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.

WITT, S.; WOHLFAHRT, G.; SCHOMBURG, D.; HECHT, H.J.; KALISZ, H.M. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of b-D-glucose. **Biochemistry Journal**, v. 347, p. 553–559, 2000.

WOHLFAHRT, G.; TRIVIC, S.; ZEREMSKI, J.; PERICIN, D.; LESKOVAC, V. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **Springer Netherlands**, v. 260, n.1, p. 69-83, 2004.

WOOLERTON, T.W.; SHEARD, S.; CHAUDHARY, Y.S.; ARMSTRONG, F.A. Enzymes and bio-inspired electrocatalysts in solar fuel devices. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 6, p. 7470-7490, 2012.

XIN HUA XU; BO HAN; FU, Y.S. Preparation of chitosan/glucose oxidase nanolayered films for electrode modification by the technique of *layer-by-layer* self-assembly. **Journal of Materials Science Letters**, v. 22, p. 695– 697, 2003.

YALÇIN, O. **Nanorods**. 1. ed. Shanghai: Intech, 2012. p. 159-178.

YANG, X.; SHEN, Y.; LI, P. Intrinsic viscosity, surface active, and flocculation of cationic polyacrylamide modified with fluorinated acrylamide. **Polym. Bull.** v. 65, p. 111-122, 2010.

YGUERABIDE, J.; YGUERABIDE, E. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications. **Analytical Biochemistry**, v. 262, p. 137–156, 1998.

ZHANFANG; DING, T. Bioconjugates of Glucose Oxidase and Gold Nanorods Based on Electrostatic Interaction with Enhanced Thermostability. **Nano Express**, v. 4, p. 1236–1240, 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Algoritmo-código da interface entre display e POCT

```
#include "mbed.h"
#include "LCDTFT.h"
#include "Touch.h"
#include "app.h"
#include <stdlib.h>
/* **** */
#define TOUCH_X_MIN 30
#define TOUCH_X_MAX 230
#define TOUCH_Y_MIN 15
#define TOUCH_Y_MAX 240
/* **** */
/* **** */
TOUCH_DATA Coordenadas;
volatile bool kbhit_irq=0;
volatile bool kbhit_tratament=0;

TouchScreenADS7843 * MyTouch = new TouchScreenADS7843(p10,p9,p12,p11,p8); // ADS7843->
SDI,SDO,SCK,CS,IRQ
/* **** */
void vISRTouchIRQ(void){
    UINT_COORDxy Temp;
    printf("vISRTouchIRQ(void)\r\n");
    MyTouch->vTestTouchPanel(&Coordenadas);
    // Coordenadas dentro del rango de pantalla LCD:
    if((Coordenadas.x>TOUCH_X_MIN && Coordenadas.x<TOUCH_X_MAX) &&
(Coordenadas.y>TOUCH_Y_MIN && Coordenadas.y<TOUCH_Y_MAX)){
        // Cambio de coordenada y escala:
        Temp=Coordenadas.y;
        Coordenadas.y=((float)((255-TOUCH_X_MIN)-Coordenadas.x)*(320.0/(TOUCH_X_MAX-
TOUCH_X_MIN)));
        Coordenadas.x=((float)(Temp-TOUCH_Y_MIN)*(240.0/(TOUCH_Y_MAX-TOUCH_Y_MIN)));
        printf("x=%d,y=%d\r\n",Coordenadas.x,Coordenadas.y);
        kbhit_irq=1;
    }
}

BusOut MyBus(p13,p14,p15,p16,p17,p18,p19,p20,p30,p29,p28,p27,p26,p25,p24,p23);
LCDTFT MyLCD(p5,p6,p7,p22,p21,&MyBus);
void printNumber(float,unsigned short);

device laser('L');
device peltier('P');
device backlight('B');
deviceR sensor('R');

float readedData=0;
float recallData[4]={0,0,0,0};

void readUpdate(){
    float historicData[3];
    MyLCD.vDrawImageBMP24Bits("hearth.bmp",53/2+1,56/2);
```

```

MyTouch->vDisableInterrupt();
delete(MyTouch);
laser.turnOn();
do{
    readedData=0;
    for(int i = 0;i<3;i++){
        readedData += sensor.read();
        //historicData[i] = readedData;
    }
    readedData /= 3;//readedData = readedData/3;
}while(readedData>99.9 || readedData<0.0);
laser.turnOff();
//conformacao de dados
if(readedData<2) readedData = 0.5-0.05+(float)(rand()%10)/100;
else if(readedData<2.9) readedData = 2-0.05+(float)(rand()%10)/100;
//else if(readedData<3.6) readedData = 1-0.05+(float)(rand()%10)/100;
else if(readedData<5) readedData = 5-0.05+(float)(rand()%10)/100;
else if(readedData<10) readedData = 10-0.05+(float)(rand()%10)/100;
else if(readedData<13.8) readedData = 20-0.05+(float)(rand()%10)/100;
//fim da conformacao

printNumber(readedData,0);

MyTouch = new TouchScreenADS7843(p10,p9,p12,p11,p8);
MyTouch->vInitADS7843(USE_8BITS,&vISRTouchIRQ);
MyLCD.vLCDTFTRectangle(0,0,56,53,1,ColorWhite);
}

void recall(){
    for(int i = 0;i<3;i++){
        recallData[3-i] = recallData[2-i];
    }
    recallData[0] = readedData;
    for(int j = 0;j<4;j++) printNumber(recallData[j],j+1);
}

void saveData(){
    int numfile = 0;
    char filename[12+8];
    LocalFileSystem local("local");
    FILE * f = fopen("/local/numfile.txt", "r");
    if(f==NULL){
        f = fopen("/local/numfile.txt", "w");
        fprintf(f, "0");
    }
    fscanf(f, "%d", &numfile);

    if(numfile>9) numfile = 0;
    fclose(f);
    sprintf(filename, "/local/measure%d.txt", numfile++);
    f = fopen(filename, "w");
    if(f==NULL) {
        MyLCD.printf("erro ao criar arquivo update\r\n");
        return;
    }
    fprintf(f, "cTni\r\n");
    fprintf(f, "Actual Result:\r\n");
    fprintf(f, "\r\n%.2f ng/mL\r\n\r\n", readedData);
    fprintf(f, "Last Measures:\r\n\r\n");
    for(int i = 0; i<4;i++) fprintf(f, "%.2f mg/mL\r\n", recallData[i]);
}

```



```

fclose(f);
f = fopen("/local/numfile.txt", "w");
if(f==NULL) {
    MyLCD.printf("erro ao criar arquivo\r\n");
    return;
}
fprintf(f, "%d", numfile);
fclose(f);
}

void shutDown(){
    MyLCD.vLCDTFTFillScreen(ColorBlack);
    //backlight.turnOff();
}

int main(){
    MyTouch->vInitADS7843(USE_8BITS,&vISRTouchIRQ);
    MyLCD.vLCDTFTInit();
    MyLCD.vLCDTFTFillScreen(ColorBlue);
    MyLCD.vLCDTFTSetParametersPrintf(10,20,10,229,2,ColorYellow);

    button play("p_play.bmp", "p_pause.bmp", readUpdate, NULL, 50, 320-35-2, 70, 70, &MyLCD);
    button stop("p_stop.bmp", "r_stop.bmp", recall, NULL, 121, 320-35-2, 70, 70, &MyLCD);
    button save(NULL, NULL, saveData, NULL, 181, 320-35-2, 70, 70, &MyLCD);
    button power(NULL, NULL, shutDown, NULL, 240-37, 37, 70, 70, &MyLCD);

    while(1){
        MyLCD.vLCDTFTFillScreen(ColorBlack);
        printf("toque na tela para continuar!\r\n");
        while(!kbhit_irq);
        kbhit_irq = 0;
        //backlight.turnOn();
        printf("continuando apos timeout\r\n");
        MyLCD.vDrawImageBMP24Bits("open.bmp");//,320/2,480/2);
        printf("toque na tela para continuar!\r\n");
        while(!kbhit_irq);
        kbhit_irq = 0;
        MyLCD.vDrawImageBMP24Bits("tela2v.bmp");//,320/2,480/2);
        MyLCD.vDrawImageBMP24Bits(play.pp(), play.px(), play.py());
        MyLCD.vDrawImageBMP24Bits("ctni.bmp", 26, (320-65)/2);
        while(1){
            if(kbhit_irq){
                kbhit_irq = 0;
                //MyLCD.vLCDTFTCircle(Coordenadas.x, Coordenadas.y, 2, 1, ColorBlue);
                play.click();
                stop.click();
                save.click();
                power.click();

                if(play.isPressed()) {
                    MyLCD.vDrawImageBMP24Bits(play.pp(), play.px(), play.py());
                    play.setState(0);
                    MyLCD.vDrawImageBMP24Bits(play.pr(), play.px(), play.py());
                }

                if(stop.isPressed()) {
                    MyLCD.vDrawImageBMP24Bits(stop.pp(), stop.px(), stop.py());

```

```

        stop.setState(0);
        MyLCD.vDrawImageBMP24Bits(stop.pr(),stop.px(),stop.py());
    }

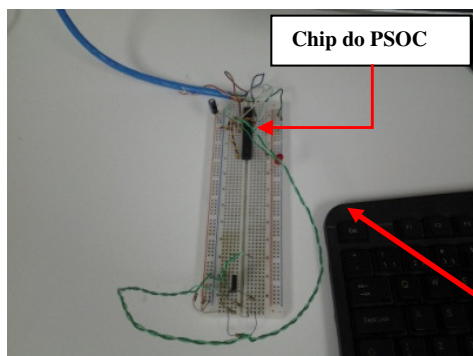
    if(save.isPressed()) save.setState(0);
    if(power.isPressed()) {power.setState(0); break;}
}
}
}

void printNumber(float number,unsigned short line){
    if(number>99.99 || number<0.0){
        printf("erro: tentativa de escrever numero maior que 9.99, leitura = %.2f\r\n",number);
        MyLCD.vDrawImageBMP24Bits("error.bmp",60,160+49/2);
        return;
    }

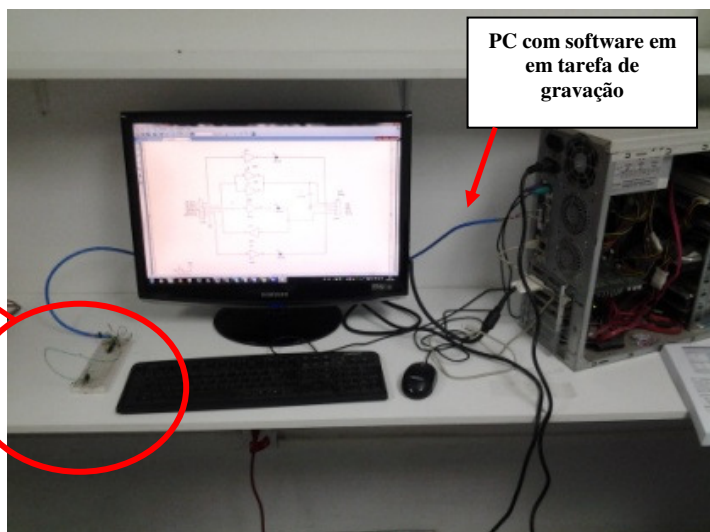
    else printf("leitura = %.2f\r\n",number);
    char numero[6] = "\0";
    char path[10] = "\0";
    unsigned char offset = 0;
    sprintf(numero,"%.2f",number);
    int i;
    for(i=0;i<strlen(numero);i++){
        if(numero[i]!='.')sprintf(path,"point.bmp");
        else sprintf(path,"%c.bmp",numero[i]);
        //MyLCD.printf("%s\r\n",path);
        if(line == 0) offset = 0;
        else offset = 10;
        //MyLCD.vLCDTFTRectangle(60+line*30+offset+7-70,160+49/2+8-
16,60+line*30+offset+7,160+49/2+8,1,ColorWhite);
        MyLCD.vDrawImageBMP24Bits(path,60+line*20+offset,160+49/2-i*14);
    }
    if(number<10) MyLCD.vDrawImageBMP24Bits("clear.bmp",60+line*20+offset,160+49/2-i*14);
    MyLCD.vDrawImageBMP24Bits("ngml.bmp",60+line*20+offset,160+30/2-56-73/2);
    //MyLCD.printf("%s\r\n",numero);
}

```

APÊNDICE B – Instrumentação de gravação do chip – PSOC.

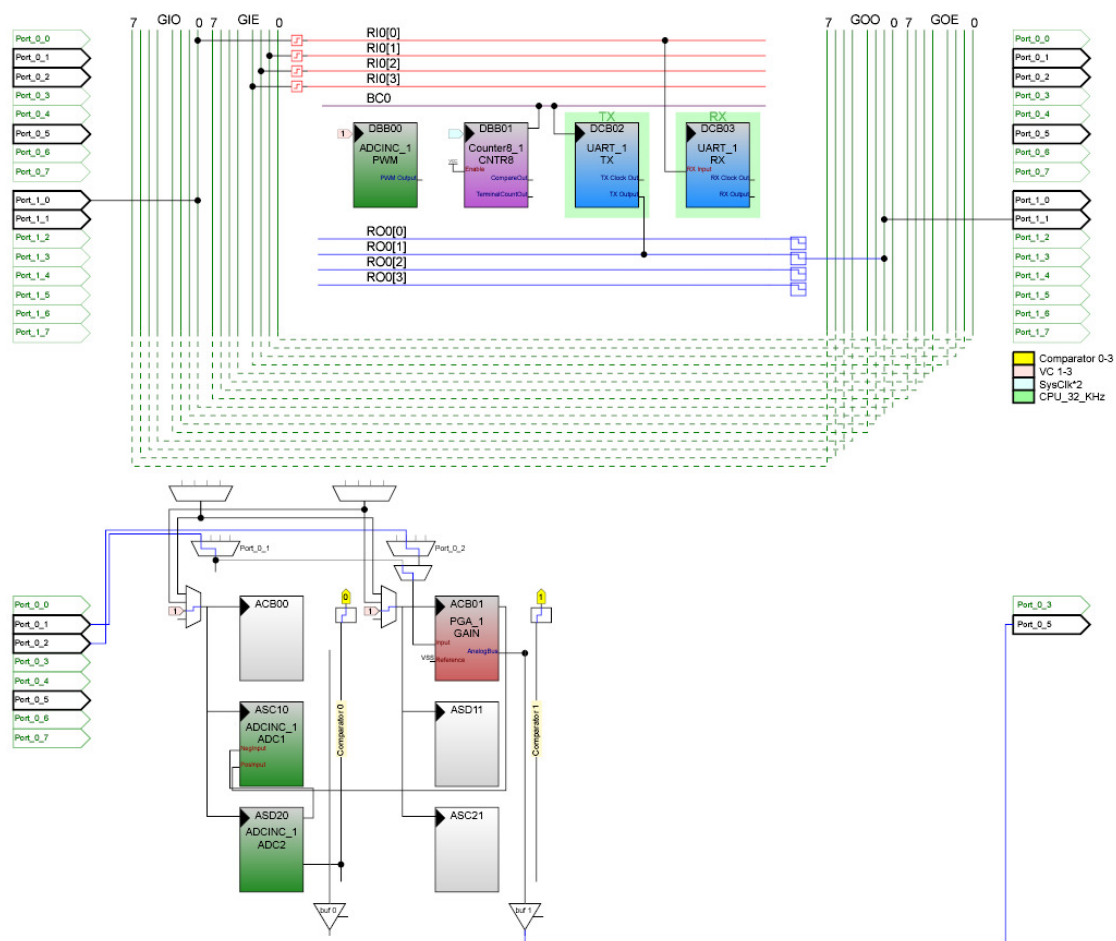


Chip do PSOC



PC com software em
em tarefa de
gravação

APÊNDICE C - Diagrama de blocos com circuito de ganho.

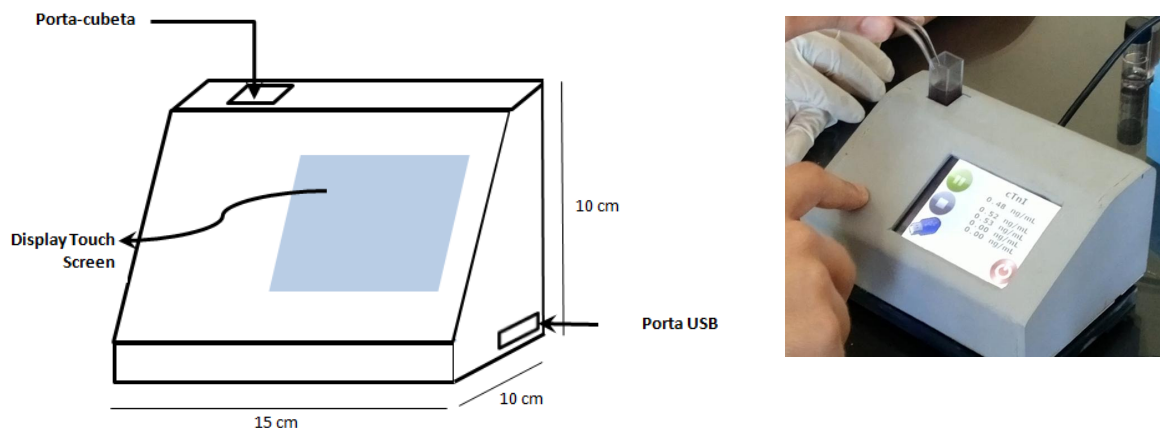


APÊNDICE D – Estação de solda para circuito SMD, marca YA XUN 702



APÊNDICE E – Apresentação do POCTV3 desde o croqui até imagens do equipamento em operação. Esta versão do dispositivo também funciona como analisador cinético, uma vez que o software seja solicitado.

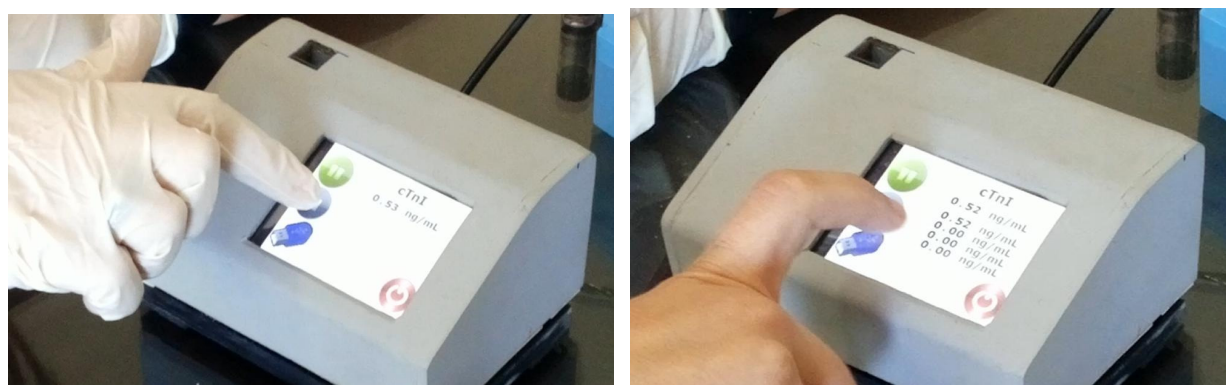
1- Croqui do POCTV3. E imagem com momento da remoção da cubeta.



2- Carcaça do POCTV3, em sua face posterior. Visão panorâmica do POCTV3



3- POCTV3 em operação no momento do acionamento da touchscreen no botão STOP. Após o comando STOP a tela apresenta os últimos quatro registros de leitura.



ANEXOS

ANEXO 1 – Tabelas de valores do teste t de Student para vários níveis de probabilidade

Valores de t para Vários Níveis de Probabilidade					
Graus de Liberdade	80%	90%	95%	99%	99,9%
1	3,08	6,31	12,7	63,7	637
2	1,89	2,92	4,30	9,92	31,6
3	1,64	2,35	3,18	5,84	12,9
4	1,53	2,13	2,78	4,60	8,61
5	1,48	2,02	2,57	4,03	6,87
6	1,44	1,94	2,45	3,71	5,96
7	1,42	1,90	2,36	3,50	5,41
8	1,40	1,86	2,31	3,36	5,04
9	1,38	1,83	2,26	3,25	4,78
10	1,37	1,81	2,23	3,17	4,59
15	1,34	1,75	2,13	2,95	4,07
20	1,32	1,73	2,09	2,84	3,85
40	1,30	1,68	2,02	2,70	3,55
60	1,30	1,67	2,00	2,62	3,46
∞	1,28	1,64	1,96	2,58	3,29

Fonte: Rorabacher, Anal. Chem., 1991, v. 63, Copyright 1991. American Chemical Society.

O intervalo de confiança (IC) para a média é a faixa de valores entre os quais se espera que a média da população μ esteja contida, considerando uma certa probabilidade, o IC para

$$\mu \text{ corresponde a } \mu = \bar{X} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$$

ANEXO 2 – Tabelas de valores críticos de F para o teste-F

Valores Críticos de F em um Nível de Probabilidade de 5% (Nível de Confiança de 95%)									
Graus de Liberdade (Denominador)	Graus de Liberdade (Numerador)								∞
	2	3	4	5	6	10	12	20	
2	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,40	19,41	19,45	19,50
3	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,79	8,74	8,66	8,53
4	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	5,96	5,91	5,80	5,63
5	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,74	4,68	4,56	4,36
6	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,06	4,00	3,87	3,67
10	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	2,98	2,91	2,77	2,54
12	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,75	2,69	2,54	2,30
20	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,35	2,28	2,12	1,84
∞	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,83	1,75	1,57	1,00

Fonte: Rorabacher, Anal. Chem., 1991, v. 63, Copyright 1991. American Chemical Society.

ANEXO 3 – Configuração eletrônica e dados do PSOC

PSoC Designer Configuration Sheet	Fotmetro CY8C24223B Sun Aug 25 00:02:39 2013
--	---

ADCINC ADCINC_1

Counter8 Counter8_1

PGA PGA_1

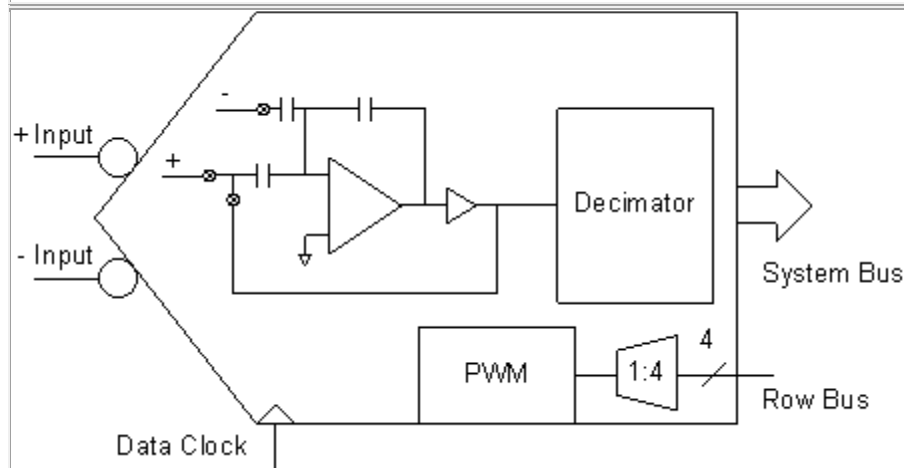
UART UART_1

Signal Pin Table (fotmetro)					
P i n #	P o r t	L a b e l	S e l e c t	D r i v e	I n t e r r u p t
1	P0[7]	Port_0_7	StdCPU	Strong	DisableInt
2	P0[5]	AnalogOutBuf_1	AnalogOutBuf_1	High Z Analog	DisableInt
3	P0[3]	Port_0_3	StdCPU	High Z	DisableInt
4	P0[1]	sensor	AnalogInput	High Z Analog	DisableInt
5	SMP				
6	P1[7]	Port_1_7	StdCPU	High Z Analog	DisableInt
7	P1[5]	Port_1_5	StdCPU	High Z Analog	DisableInt
8	P1[3]	Port_1_3	StdCPU	High Z Analog	DisableInt
9	P1[1]	TX	GlobalOutOdd_1	Strong	DisableInt
10	VSS				
11	P1[0]	RX	GlobalInOdd_0	High Z	DisableInt
12	P1[2]	Port_1_2	StdCPU	High Z Analog	DisableInt
13	P1[4]	Port_1_4	StdCPU	High Z Analog	DisableInt
14	P1[6]	Port_1_6	StdCPU	High Z Analog	DisableInt
15	XRES				
16	P0[0]	peltier	StdCPU	Strong	DisableInt
17	P0[2]	offset	AnalogInput	High Z Analog	DisableInt
18	P0[4]	backlight	StdCPU	High Z Analog	DisableInt
19	P0[6]	laser	StdCPU	Strong	DisableInt
20	VDD				

Selected Global Parameters (fotmetro)	V a l u e
32K_Select	Internal
A_Buff_Power	Low
Analog Power	SC On/Ref High
CPU_Clock	SysClk/8

LVDThrottleBack	Disable
Op-Amp Bias	Low
PLL_Mode	Disable
Power Setting [Vcc / SysClk freq]	3.3V / 24MHz
Ref Mux	(Vdd/2)+/- (Vdd/2)
Sleep_Timer	512_Hz
SwitchModePump	OFF
SysClk Source	Internal
SysClk*2 Disable	No
Trip Voltage [LVD (SMP)]	4.81V (5.00V)
VC1= SysClk/N	10
VC2= VC1/N	10
VC3 Divider	256
VC3 Source	VC2
Watchdog Enable	Disable

User Module Detail ADCINC_1 (ADCINC)



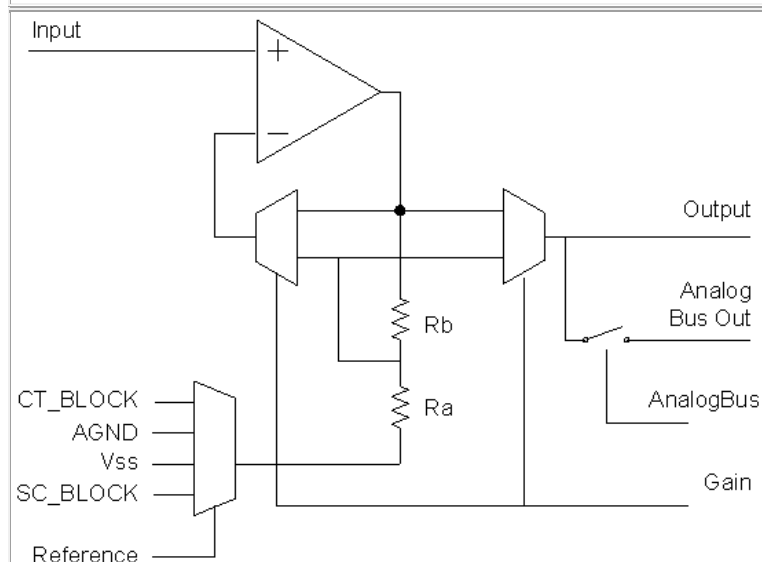
Parameters	Value
ClockPhase	Normal
Data Clock	VC1
DataFormat	Unsigned
NegInput	ASD20
NegInputGain	Disconnected
PWM Output	None
PosInput	ACB01
PulseWidth	1
Resolution	14 Bit

Blocks

Block	Type	Location	
ADC1	ANALOG_SC	1 0	
Registers	Name	Address	Value
CR0	ASC10CR0	80	88
CR1	ASC10CR1	81	80
CR2	ASC10CR2	82	20
CR3	ASC10CR3	83	fc
Block	Type	Location	
ADC2	ANALOG_SC	2 0	
Registers	Name	Address	Value
CR0	ASD20CR0	90	90
CR1	ASD20CR1	91	0
CR2	ASD20CR2	92	60
CR3	ASD20CR3	93	f0
Block	Type	Location	
PWM	DIGITAL	0	
Registers	Name	Address	Value
CONTROL_0	DBB00CR0	23	0
DATA_0	DBB00DR0	20	0
DATA_1	DBB00DR1	21	0
DATA_2	DBB00DR2	22	1
DIG_BasicFunction	DBB00FN	120	31
DIG_Input	DBB00IN	121	15
DIG_Output	DBB00OU	122	40
User Module Detail Counter8_1 (Counter8)			
Parameters	Value		
Clock	SysClk*2		
ClockSync	Sync to SysClk*2		
CompareOut	None		
CompareType	Less Than Or Equal		
CompareValue	78		
Enable	High		
InterruptType	Terminal Count		
InvertEnable	Normal		
Period	155		
TerminalCountOut	None		

Blocks			
Block	Type	Location	
CNTR8	DIGITAL	1	
Registers	Name	Address	Value
CONTROL_0	DBB01CR0	27	0
DATA_0	DBB01DR0	24	0
DATA_1	DBB01DR1	25	9b
DATA_2	DBB01DR2	26	4e
DIG_BasicFunction	DBB01FN	124	61
DIG_Input	DBB01IN	125	14
DIG_Output	DBB01OU	126	80

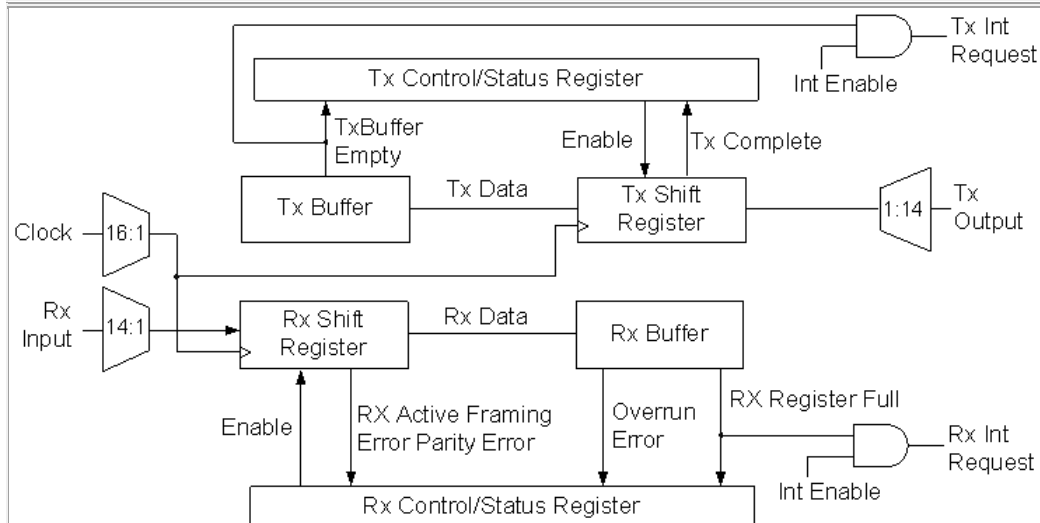
User Module Detail PGA_1 (PGA)



Parameters	Value
AnalogBus	AnalogOutBus_1
Gain	1.000
Input	AnalogColumn_InputSelect_1
Reference	VSS

Blocks			
Block	Type	Location	
GAIN	ANALOG_CT	0 1	
Registers	Name	Address	Value
CR0	ACB01CR0	75	fe
CR1	ACB01CR1	76	a1
CR2	ACB01CR2	77	20
CR3	ACB01CR3	74	0

User Module Detail UART_1 (UART)



Parameters	Value
Clock	Row_0_Broadcast
ClockSync	Unsynchronized
CommandTerminator	13
Enable_BackSpace	Disable
IgnoreCharsBelow	32
InvertRX Input	Normal
Param_Delimiter	32
RX Clock Out	None
RX Input	Row_0_Input_0
RX Output	None
RxBufferSize	16
RxCmdBuffer	Enable
TX Clock Out	None
TX Interrupt Mode	TXComplete
TX Output	Row_0_Output_1

Block	Type	Location	Value
TX	DIGITAL_COMM	2	
Registers	Name	Address	Value
CONTROL_0	DCB02CR0	2b	0
DATA_0	DCB02DR0	28	0
DATA_1	DCB02DR1	29	0
DATA_2	DCB02DR2	2a	0
DIG_BasicFunction	DCB02FN	128	1d

DIG_Input	DCB02IN	129	2
DIG_Output	DCB02OU	12a	5
Block	Type	Location	
RX	DIGITAL_COMM	3	
Registers	Name	Address	Value
CONTROL_0	DCB03CR0	2f	0
DATA_0	DCB03DR0	2c	0
DATA_1	DCB03DR1	2d	0
DATA_2	DCB03DR2	2e	0
DIG_BasicFunction	DCB03FN	12c	5
DIG_Input	DCB03IN	12d	c2
DIG_Output	DCB03OU	12e	0

Configuration Analog and Global Register Values

Analog Clocks (fotmetro) Name	Value
AnalogClock_0_Select	
AnalogClock_1_Select	
AnalogColumn_Clock_0	VC1
AnalogColumn_Clock_1	VC1

Analog Input MUX (fotmetro) Name	Value
AnalogColumn_InputMUX_0	Port_0_1
AnalogColumn_InputMUX_1	Port_0_2

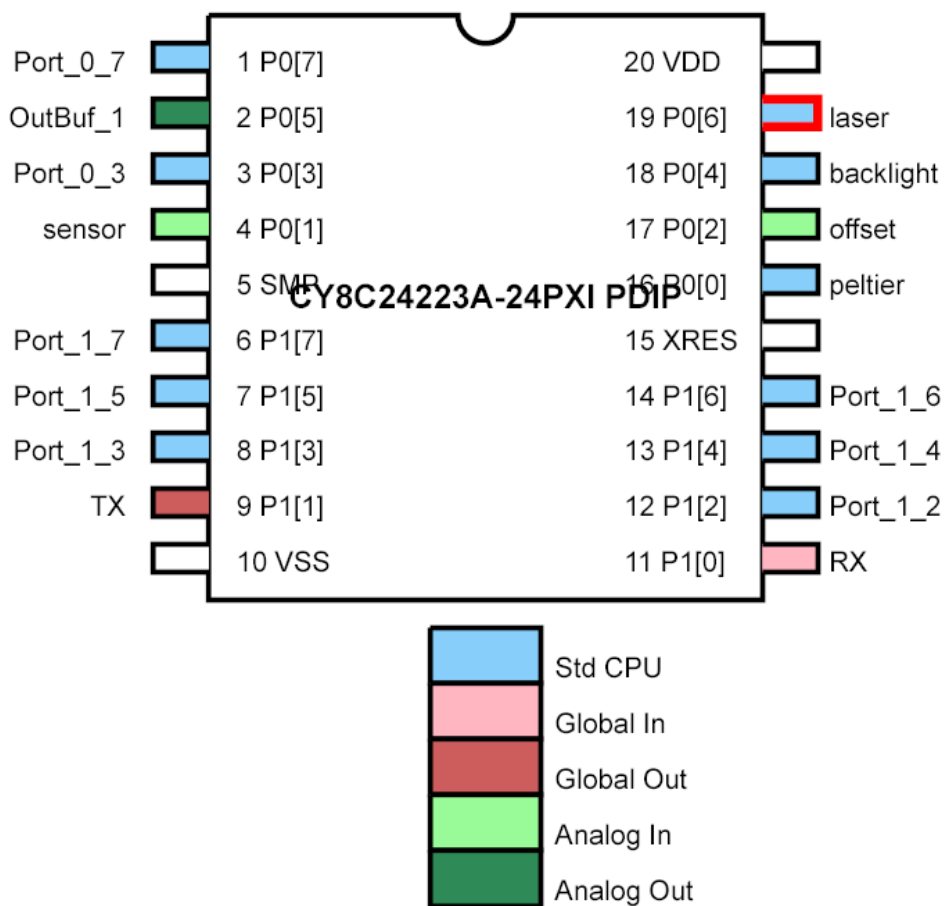
Analog Buffer Output (fotmetro) Name	Value
AnalogOutBuf_0	OFF
AnalogOutBuf_1	Port_0_5

Global Register Values (fotmetro) Register	Name	Address	Value
AnalogClockSelect1	CLK_CR1	161	0
AnalogClockSelect2	CLK_CR2	169	0
AnalogColumnClockSelect	CLK_CR0	160	0
AnalogColumnInputSelect	AMX_IN	60	4
AnalogComparatorControl1	CMP_CR1	66	0
AnalogIOControl_0	ABF_CR0	162	a0
AnalogLUTControl0	ALT_CR0	167	33
AnalogLUTControl1	ALT_CR1	168	0

AnalogModulatorControl_0	AMD_CR0	163	0
AnalogModulatorControl_1	AMD_CR1	166	0
AnalogReferenceControl	ARF_CR	63	17
AnalogSyncControl	ASY_CR	65	0
DecimatorControl_0	DEC_CR0	e6	0
DecimatorControl_1	DEC_CR1	e7	2
GlobalDigitalInterconnect_Drive_Even_Input	GDI_E_IN	1d1	0
GlobalDigitalInterconnect_Drive_Even_Output	GDI_E_OU	1d3	0
GlobalDigitalInterconnect_Drive_Odd_Input	GDI_O_IN	1d0	0
GlobalDigitalInterconnect_Drive_Odd_Output	GDI_O_OU	1d2	0
I2Cconfig	I2CCFG	d6	0
OscillatorControl_1	OSC_CR1	1e1	199
OscillatorControl_2	OSC_CR2	1e2	0
OscillatorControl_3	OSC_CR3	1df	1ff
OscillatorControl_4	OSC_CR4	1de	2
OscillatorGlobalBusEnableControl	OSC_GO_EN	1dd	0
Port_0_Data	PRT0DR	0	0
Port_0_DriveMode_0	PRT0DM0	100	c1
Port_0_DriveMode_1	PRT0DM1	101	3e
Port_0_DriveMode_2	PRT0DM2	3	36
Port_0_GlobalSelect	PRT0GS	2	0
Port_0_IntCtrl_0	PRT0IC0	102	0
Port_0_IntCtrl_1	PRT0IC1	103	0
Port_0_IntEn	PRT0IE	1	0
Port_1_Data	PRT1DR	4	0
Port_1_DriveMode_0	PRT1DM0	104	2
Port_1_DriveMode_1	PRT1DM1	105	Fd
Port_1_DriveMode_2	PRT1DM2	7	Fc
Port_1_GlobalSelect	PRT1GS	6	3
Port_1_IntCtrl_0	PRT1IC0	106	0
Port_1_IntCtrl_1	PRT1IC1	107	0
Port_1_IntEn	PRT1IE	5	0
Port_2_Data	PRT2DR	8	0
Port_2_DriveMode_0	PRT2DM0	108	0
Port_2_DriveMode_1	PRT2DM1	109	0
Port_2_DriveMode_2	PRT2DM2	b	0
Port_2_GlobalSelect	PRT2GS	a	0
Port_2_IntCtrl_0	PRT2IC0	10a	0
Port_2_IntCtrl_1	PRT2IC1	10b	0
Port_2_IntEn	PRT2IE	9	0
Row_0_InputMux	RDI0RI	b0	2

Row_0_InputSync	RDI0SYN	b1	0
Row_0_LogicInputAMux	RDI0IS	b2	0
Row_0_LogicSelect_0	RDI0LT0	b3	33
Row_0_LogicSelect_1	RDI0LT1	b4	33
Row_0_OutputDrive_0	RDI0SRO0	b5	40
Row_0_OutputDrive_1	RDI0SRO1	b6	0

ANEXO 4 – Pinagem do dispositivo *POCT*



ANEXO 5 – Dados experimentais de testes realizados com o POCT desenvolvido com o objetivo de detectar troponina-I (TnI) em sangue humano. Para o sensor plasmônico foram utilizados NBAu revestido com polieletrólitos e anti-troponina I. estes resultados foram cedidos gentilmente pelo doutor Josivandro do Nascimento Silva, o qual utilizou este dispositivo eletrônico tipo POCT para validar os dados desenvolvidos em sua tese de doutorado cujo título foi: Síntese de nanopartículas anisotrópicas: controle de morfologia, funcionalização e desenvolvimento de um sensor para Troponina I.

Amostras	POCT (ADC)	ELISA (ng mL ⁻¹)	POC (ng mL ⁻¹)
1	9566	0,01	22,14
2	9603	0,01	22,06
3	9629	0,01	21,97
4	9884	0,04	21,27
5	9760	0,04	21,63
6	9763	0,04	21,65
7	9343	0,04	22,75
8	9326	0,04	22,71
9	9280	0,04	22,86
10	10010	0,02	21,05
11	10008	0,02	21,00
12	9956	0,02	21,10
13	8805	0,02	24,12
14	9389	0,02	22,63
15	9604	0,02	22,07
16	9016	0,72	23,66
17	9125	0,72	23,27
18	9289	0,72	22,84
19	9441	0,72	22,48
20	9413	0,30	22,50
21	9372	0,30	22,47
22	9317	0,30	22,76
23	9346	0,30	22,64
24	9418	3,03	22,47
25	9425	3,03	22,51
26	9422	3,03	22,49
27	9426	3,03	22,51
28	11604	2,93	16,91
29	11620	2,93	16,85
30	11797	2,93	16,45
31	11664	2,93	16,67
32	11854	0,01	16,28
33	12046	0,01	15,80
34	12113	0,01	15,57
35	12353	0,01	15,13
36	12411	0,01	14,92
37	11776	7,06	16,41
38	12309	7,06	15,08
39	12527	7,06	14,59
40	12581	7,06	14,38