



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA



Henri Alves de Godoy

Contribuições para a detecção de bactérias em ambientes hospitalares utilizando imunossensores eletroquímicos

Contributions to the detection of bacteria in hospital environments using electrochemical immunosensors

Limeira – SP

Dezembro de 2021

Henri Alves de Godoy

Contribuições para a detecção de bactérias em ambientes hospitalares utilizando imunossensores eletroquímicos

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Doutor em Tecnologia, na área de Sistemas de
Informação e Comunicação.

Orientador: Prof. Dr. Rangel Arthur

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO HENRI ALVES
DE GODOY, E ORIENTADA PELO PROF. DR. RANGEL
ARTHUR.

Limeira – SP
Dezembro de 2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia
Felipe de Souza Bueno - CRB 8/8577

G548c Godoy, Henri Alves de, 1973-
Contribuições para a detecção de bactérias em ambientes hospitalares utilizando imunossensores eletroquímicos / Henri Alves de Godoy. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Rangel Arthur.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Análise eletroquímica. 2. Detectores. 3. Nanotecnologia. 4. Staphylococcus aureus. 5. Óxido de zinco. I. Arthur, Rangel, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Contributions to the detection of bacteria in hospital environments using electrochemical immunosensors

Palavras-chave em inglês:

Electrochemical analysis

Detectors

Nanotechnology

Staphylococcus aureus

Zinc oxide

Área de concentração: Sistemas de Informação e Comunicação

Titulação: Doutor em Tecnologia

Banca examinadora:

Rangel Arthur [Orientador]

Leandro Ronchini Ximenes

Plinio Trabasso

Ricardo Barroso Leite

Vicente Idalberto Becerra Sablón

Data de defesa: 02-12-2021

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0375-695X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8259278661400679>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Abaixo se apresentam os membros da comissão julgadora da sessão pública de defesa de dissertação para o Título de Doutor em Tecnologia na área de concentração de Sistemas de Informação e Comunicação, a que submeteu o aluno Henri Alves de Godoy, em 02 de dezembro de 2021 na Faculdade de Tecnologia- FT/ UNICAMP, em Limeira/SP.

Prof. Dr. Rangel Arthur

Presidente da Comissão Julgadora

Prof. Dr. Leandro Ronchini Ximenes

FT

Prof. Dr. Dr. Plinio Trabasso

FCM

Prof. Dr. Dr. Ricardo Barroso Leite – IFSP

IFSP

Prof. Dr. Vicente Idalberto Becerra Sablón

USF

Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-graduação da FT.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela vida e por estar comigo todos os dias realizando todos os desejos do meu coração.

A minha esposa Angela por estar sempre ao meu lado me incentivando nos estudos e dedicando sua atenção e seu amor incondicional.

Aos meus filhos Gabriella e Eduardo, joias preciosas, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência durante o trabalho e por me alegrar nos momentos difíceis.

Aos meus pais Silva e Hélio por todo o esforço e incentivo para com os estudos, pela educação e por sempre me conduzir nos passos corretos que serviram de alicerce para toda vida.

Ao meu irmão Eric pelos seus conselhos, amor e carinho.

Ao Prof. Dr. Rangel, pela amizade ao longo do período que trabalhamos juntos e dedicação na condução da orientação, pela confiança, motivação, mostrando os caminhos para a realização da pesquisa.

A equipe do Laboratório Multidisciplinar em Alimentos e Saúde (LabMAS) e do Laboratório de Lácteos, Probióticos e Prebióticos (LLPP) e professoras das Faculdades de Ciências Aplicadas (FCA) pelo fornecimento dos materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa e o apoio aos experimentos.

As pesquisadoras do Laboratório de Nano, Microssistemas e Materiais (DINAM) do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) pela parceria e utilização da infraestrutura, pelo compartilhamento do conhecimento, colaborando para o sucesso desse trabalho.

À Faculdade de Tecnologia (FT) por sua excelência do programa de pós-graduação oferecendo toda estrutura necessária para os estudos dos seus alunos.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de estudar em uma universidade prestigiada e reconhecida mundialmente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001, pelo apoio durante a realização do trabalho.

Resumo

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um patógeno que causa doenças infecciosas associadas à saúde (IRAS) em hospitais, centros cirúrgicos ambulatoriais e outras instalações de saúde. As infecções hospitalares são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade e podem sobreviver mais de duas horas na superfície das mãos. Com a pandemia do COVID-19 percebemos a importância da lavagem das mãos para prevenir a transmissão do vírus SARS-CoV-2. No entanto, a busca por dispositivos que garantem que os procedimentos de assepsia das mãos foram realizados seguindo a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS) continua sendo um problema a ser solucionado. Com o avanço da nanotecnologia o uso de nanomaterias em conjunto com os biossensores tem surgido como aliado no combate as doenças infecciosas sendo considerado uma ferramenta promissora, de baixo custo, de detecção rápida e de alta sensibilidade. Com base em medições eletroquímicas foram desenvolvidos nanobastões de óxido de zinco (ZnO) para detectar a presença de bactérias *S. aureus* após a assepsia das mãos. As medições de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foram usadas para detectar as bactérias em uma faixa de 10^4 a 10^8 UFC.mL⁻¹ em 30 min. O imunossensor conseguiu detectar $2,6 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ com especificidade e seletividade e demonstrou uma excelente resposta na presença de *S. aureus* e pode ser integrado no dia a dia dos profissionais de saúde e em locais de atendimento ao paciente (*point-of-care*) para contribuir com o monitoramento e acompanhamento das infecções hospitalares durante o período de internação do paciente.

Palavras-chave: Análise eletroquímica, detectores, nanotecnologia, *Staphylococcus aureus*, óxido de zinco.

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a pathogen that causes health-associated infectious diseases (HAI) in hospitals, outpatient surgical centers, and other healthcare facilities. Hospital infections are responsible for high rates of morbidity and mortality and can survive for more than two hours on the surface of the hands. With the COVID-19 pandemic, we realized the importance of handwashing to prevent the transmission of the SARS-CoV-2 virus. However, the seek for devices that guarantee that hand asepsis procedures were performed following the World Health Organization (WHO) recommendation remains a problem to be solved. With the advancement of nanotechnology, the use of nanomaterials with biosensors has emerged as an ally in the fight against infectious diseases and is considered a promising, low-cost, rapid detection, and high-sensitivity tool. Based on electrochemical measurements, zinc oxide (ZnO) nanorods were developed to detect the presence of *S. aureus* bacteria after hand asepsis. Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry measurements were used to detect bacteria in a range of 10^4 to 10^8 CFU.mL⁻¹ in 30 min. The immunosensor was able to detect 2.6×10^3 CFU.mL⁻¹ with specificity and selectivity and demonstrated an excellent response in the presence of *S. aureus* and can be integrated into the daily lives of health workers and in healthcare facilities (point-of-care) to contribute to the monitoring and follow-up of hospital infections during the patient's hospital stay.

Keywords: Electrochemical analysis, detectors, nanotechnology, *Staphylococcus aureus*, zinc oxide.

Lista de Ilustrações

Figura 2.1 - Diretrizes sobre a higienização das mãos em 6 etapas. Fonte: Figura adaptada de [30].	20
Figura 2.2 - Ilustração das alterações dos níveis de energia de emissão e excitação. Fonte: Figura adaptada de [34].	21
Figura 2.3 - Espectro luminoso com os tipos de radiações e comprimentos das ondas eletromagnéticas. Fonte: Figura adaptada de [34].	22
Figura 2.4 - Figura de 3 fontes de luzes UV. Lâmpada de Luz Negra (a), Lâmpada UV-C (b) e LED UV-A (c). Fonte: Própria (2021).	23
Figura 2.5 - Componentes típicos de um imunossensor desde a coleta, reconhecimento biológico e o processamento do sinal. Fonte: Figura adaptada de [44].	24
Figura 2.6 - Ilustração de uma base sensora em cerâmica com a identificação de cada um dos 3 eletrodos. Fonte: Figura adaptada de Metrohm (2021).	26
Figura 2.7 - Imagem por MEV dos nanobastões de ZnO crescidos na base sensora e ampliados a 100 kx. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).	27
Figura 2.8 - Voltamograma representando uma medição CV e as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). Fonte: Própria (2021).	28
Figura 2.9 - Voltamograma representando uma medição DPV e a corrente de pico (I_p). Fonte: Própria (2021).	29
Figura 2.10 - Montagem de um potenciostato experimental utilizando o Arduino (Projeto JUAMI). Fonte: Própria (2021).	30
Figura 2.11 - Ilustração de aglutinações entre anticorpos e antígenos (Ab-Ag). Fonte: Própria (2021).	30
Figura 3.1 - Mão do autor com a aplicação do gel Glo Germ e sua fluorescência ao incidir uma luz UV-A. Fonte: Própria (2021).	34
Figura 4.1 - PCB produzida pelo CTI com os eletrodos. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).	43
Figura 4.2 - Dropsens modelo C220AT utilizado no trabalho. Fonte: Própria (2021).	44

Figura 4.3 - Teste do anticorpo anti- <i>S. aureus</i> com a placa sólida de ELISA de 96 poços. Fonte: Própria (2021).	45
Figura 4.4 - Imagem obtida por MEV do crescimento dos nanobastões na base sensora. Imagem ampliada em 10 kx. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).	46
Figura 4.5 - Imagem obtida por MEV do crescimento dos nanobastões na base sensora. Imagem ampliada em 100 kx. Visualização do topo em hexagonal. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).	46
Figura 4.6 - Imagem do potenciostato Autolab de bancada PGSTAT302N. Fonte: Metrohm (2021).	48
Figura 4.7 - Imagem do potenciostato portátil modelo PSTAT 910 com interface para o sensor dropsens. Fonte: Própria (2021).	48
 Figura 5.1 - Imagens das placas com as culturas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> contendo: (a) e (c) cultura de bactérias não diluídas; (b) e (d) bactérias inativadas termicamente. Fonte: Própria (2021).	50
Figura 5.2 - Imagens das placas com as culturas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> contendo: (a) e (c) cultura de bactérias não diluídas; (b) e (d) bactérias com tratamento SDS. Fonte: Própria (2021).	51
Figura 5.3 - Absorbância obtida pelo método ELISA indireto com amostras preparadas com diluições 1:5 e 1:10 de bactérias e diluições de anticorpos 1:1000 e 1:10000. Fonte: Própria (2021).	52
Figura 5.4 - Imagens obtidas por MEV dos nanobastões de ZnO cultivados no eletrodo de trabalho com ampliação de 2.73 kx (a) e 23.4 kx (b). Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).	53
Figura 5.5 - Medições de CV da base sensora, base sensora com ZnO NRs e o imunossensor com uma taxa de varredura de 100 mVs ⁻¹ em 10 mmol.L ⁻¹ K ₄ [Fe (CN) ₆] e 0,5 mol.L ⁻¹ NaNO ₃ .	54
Figura 5.6 - Medições de CV comparando as duas concentrações de ferrocianeto de potássio de 10 mM e 2,5 mM.	55
Figura 5.7 - Medições de CV em uma base sensora após 10 ciclos de varredura.	55
Figura 5.8 - Medições de CV em uma segunda base sensora após 5 ciclos de varredura.	56
Figura 5.9 - Medições de CV em uma terceira base sensora após 5 ciclos de varredura.	56
Figura 5.10 - Medições de CV em 3 bases sensoras diferentes para o cálculo do coeficiente de variação do I _{pa} .	57

Figura 5.11 - Medição de CV de 3 imunossensores e a variação do pico I_{pa} (6 μA).	57
Figura 5.12 - Medição por DPV de 3 imunossensores e a variação da corrente de pico I_p (0.13 μA).	58
Figura 5.13 - Medições de CV de 2 tempos de incubações diferentes no imunossensores e o valor da corrente de pico anódica I_{pa} de 15min (5.4 μA) e 30min (1.3 μA).	58
Figura 5.14 - Medições de DPV dos tempos 15min e 30min de incubações diferentes no imunossensores e o valor da corrente de pico I_p (0.11 μA).	59
Figura 5.15 - Medições em CV para obtenção da curva de calibração com diferentes concentrações de <i>S. aureus</i> variando de 10^4 - 10^8 UFC.mL ⁻¹	61
Figura 5.16 - Coeficiente de linearidade representando o pico de corrente anódica em relação a concentração de bactérias <i>S. aureus</i> na faixa de 10^4 - 10^8 UFC.mL ⁻¹	62
Figura 5.17 - Medições de CV no imunossensor com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> . com taxa de varredura em 100 mVs ⁻¹ e potencial variando de -0,6V a 0,6V.	63
Figura 5.18 - Medições de DPV no imunossensor com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> com taxa de varredura em 100 mVs ⁻¹ e potencial variando de -0,1V a 0,6V.	63
Figura 5.19 - Medições de CV no imunossensor com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> sem o processo de inativação e sua concentração de 10^8 UFC.mL ⁻¹ (não diluído).	64

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Frequência e permanência de patógenos nas mãos dos profissionais de saúde. Fonte: Tabela adaptada de [8].	19
Tabela 3. 1 - Comparação entre os agentes sabão, clorexidina e álcool para lavagem das mãos e suas características. Fonte: Tabela adaptada de [69].	32
Tabela 3.2 - Comparação das técnicas de detecções de patógenos mais comuns e as características principais. Fonte: Própria (2021).	41
Tabela 5.1 - Comparação entre os vários métodos de detecções e os tipos de biossensores mais relevantes encontrados na literatura em detalhes. Fonte: Própria (2021).	60

Lista de abreviaturas e siglas

μA: microampère

μL: microlitro

Ab: do inglês *Antibody* (anticorpo)

Ag: do inglês *Antigen* (antígeno)

CE: do inglês *Counter Electrode* (contra ou auxiliar eletrodo)

COVID-19: Doença do Coronavírus 2019

CV: do inglês *Cyclic Voltammetry* (voltametria cíclica)

DPV: do inglês *Differential Pulse Voltammetry* (voltametria de pulso diferencial)

DNA: do inglês *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DVD: *Digital Versatile Disc*

ELISA: do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ensaios imunoenzimáticos)

GPU: do inglês *Graphics Processing Units* (unidade de processamento gráfico)

GUI: do inglês *Graphical User Interface* (interface gráfica do usuário)

Ip: Corrente de pico

Ipa: Corrente de pico anódico

Ipc: Corrente de pico catódico

IRAS: Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

ITU: Infecção do trato urinário

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LED: *Light Emitting Diode*

LOD: *Limit of detection* (limite de detecção)

MERS: *Middle East Respiratory Syndrome*

MEV: *Microscopia eletrônica de varredura*

mL: mililitro

mM: milimolar

nm: nanômetro

NP: do inglês *Nanoparticle* (nanopartícula)

NRs: *Nanorods* (nanobastões)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: do inglês *Phosphate-buffered saline* (tampão fosfato salino)

PCB: do inglês *Printed Circuit Board* (placa de circuito impresso)

PCR: do inglês *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH: Potencial Hidrogeniônico

POC: do inglês *Point-of-Care* (pontos de atendimento junto ao paciente)

RE: do inglês *Reference electrode* (eletrodo de Referência)

SARS: *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SEM: *Scanning Electron Microscopy*

SLS: do inglês *Sodium Lauryl Sulfate* (lauril éter sulfato de sódio)

SPE: *Screen-printed electrodes*

UFC: Unidade formadora de colônias

UNICEF: *United Nations International Children's Emergency Fund*

UV: do inglês *Ultraviolet* (ultravioleta)

V: Volts

Wi-fi: *Wireless fidelity*

WE: do inglês *Working Electrode* (eletrodo de Trabalho)

WHO: *World Health Organization*

ZnO: do inglês *Zinc oxide* (óxido de zinco)

Sumário

Capítulo 1 - Introdução.....	15
1.1 Contexto e relevância do trabalho	15
1.2 Objetivos	17
1.3 Estrutura do trabalho.....	17
Capítulo 2 - Fundamentação Teórica	19
2.1 Infecções Nosocomiais	19
2.2 Fluorescência	21
2.3 Biossensores.....	23
2.4 Eletrodos	25
2.5 Nanomateriais	26
2.7 Aglutinações	30
Capítulo 3 - Trabalhos Relacionados.....	31
Capítulo 4 - Metodologia.....	43
4.1 Materiais e reagentes	43
4.2 Preparação das amostras	44
4.3 Crescimento de ZnO NRs e imobilização de anticorpos	45
4.4 Caracterização do imunossensor.....	47
4.5 Medições eletroquímicas	47
4.6 Análise estatística e limite de detecção.....	49
Capítulo 5 - Testes e Resultados.....	49
5.1 Cultura e inativação bacteriana	50
5.2 Crescimento de ZnO NRs e a imobilização do anti- <i>S. aureus</i>	53
5.3 Estabilidade e reprodutibilidade	54
5.4 Tempo de incubação e curva de calibração	58
5.5 Seletividade e especificidade	62
Capítulo 6 – Conclusões	66
6.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	66
Referências	68

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Contexto e relevância do trabalho

A Infecção Hospitalar (IH) ou Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) é um problema de saúde pública já bem conhecido e discutido por várias esferas das comunidades científicas [1-2]. A lavagem correta das mãos por profissionais de saúde de acordo com padrões de orientações como a fornecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ¹ é uma prática eficaz no combate de infecções hospitalares e consequentemente ajuda a evitar a contaminação cruzada dos pacientes em uma área hospitalar [3-5].

O ato de higienizar as mãos durante a assistência ao enfermo é considerado a melhor forma de evitar a contaminação cruzada, sendo a transferência de microrganismos entre os pacientes e os profissionais de saúde. Há evidências de que ações de educação e treinamento de profissionais de saúde na higienização das mãos de forma correta e sistemática seja eficaz. Entretanto, o plano de monitorização e retreinamento muitas vezes torna-se falho, promovendo resultados variáveis a depender da aderência dos profissionais de saúde [6-8].

Com o surgimento do vírus SARS-CoV-2 em 2019 e consequentemente a declaração de pandemia em março de 2020 pela OMS [9-10], a procura e a aplicação de testes rápidos de diagnósticos do vírus tem servido como estratégia no controle e gerenciamento de pacientes que não apresentam sintomas, mas podem estar espalhando vírus se não forem tomadas medidas de isolamento [11]

A OMS recomenda que os diagnósticos do coronavírus sejam realizados através de testes moleculares do vírus, porém segundo relatório da União Europeia [12] o custo dos equipamentos, a necessidade de laboratórios bem equipados, o transporte de amostras e o treinamento de profissionais limitam a capacidade da realização dos testes em massa na população. O relatório ainda aponta a urgência na realização de testes rápidos com antígenos do vírus SARS-CoV-2 para identificação dos casos de infecções virais ativos, que sejam confiáveis e acessíveis, para o alívio temporário dos laboratórios especializados, deixando-os somente para necessidades médicas [13]

A relevância do assunto neste trabalho sobre os métodos de controle e monitoramento para prevenção de infecções bacterianas e virais por meio da higienização das mãos coincide com o atual momento global com relação à propagação do vírus SARS-CoV-2

¹ <https://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/>

desde sua descoberta em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan localizado na China [14-15]. Segundo o relatório do Hospital Tongji (Wuhan, China) [25] que analisou dados clínicos de 918 pacientes com COVID-19 no período de 30 de dezembro de 2019 a 29 de fevereiro de 2020, a taxa de mortalidade com infecções nosocomiais desses pacientes foram 15,4% maior que pacientes que não apresentaram um quadro de infecção nosocomial. As infecções nosocomiais mais comuns foram a pneumonia (32,3%) em seguida bacteremia (24,6%) e infecção do trato urinário (ITU) (21,5%) que se desenvolveram a partir do sétimo dia da doença. Os dias a mais de internação significam uma utilização maior de artefatos invasivos e uma maior exposição a patógenos, com aumento da probabilidade de que se contraia uma IRAS.

A OMS tem reforçado a necessidade da lavagem das mãos como uma das formas eficazes no combate a transmissão do vírus e o uso do álcool em gel 70% como forma rápida de higienização quando não há possibilidade da lavagem das mãos com sabão. Porém, um grande desafio está para ser vencido em países subdesenvolvidos que sofrem com a falta de saneamento básico, água limpa e potável. Segundo relatório apresentado pelo programa conjunto de monitoramento da OMS e UNICEF entre os anos 2000 e 2017 um total de 3 bilhões de pessoas não possuem instalações básicas de lavagem das mãos com água e sabão em casa [16] sugerindo aos governos de países com deficiência de infraestrutura sanitária a criação de estações móveis de higienização com água limpa e sabão.

Portanto, a necessidade de uma análise dos processos de identificação de patógenos como, por exemplo, fungos, bactérias e vírus de forma automatizada e com maior rapidez no diagnóstico faz com que essa área de pesquisa crescesse ao longo dos últimos anos. A pesquisa no desenvolvimento e criação de dispositivos portáteis e flexíveis para uso no local de atendimento do paciente, também chamados *point-of-care* (POC), para que possa ser integrado na prática diária dos profissionais de saúde, em consultórios médicos, na própria residência do paciente ou em ambientes sem infraestrutura, vem se tornando cada vez mais comum, sendo uma grande aposta para o futuro, para que novos dispositivos e aplicações se tornem viáveis e que contribuam para a melhoria da saúde dos pacientes [17-20].

A busca por materiais em escala cada vez menores teve um avanço com a evolução da nanotecnologia com a descoberta dos nanotubos de carbono, fazendo com que uma grande gama de aplicações surgisse, principalmente na área da nano medicina [21-23]. Nesse contexto um importante material se apresenta, o óxido de zinco (ZnO), de fácil manipulação e síntese [24], será utilizado como suporte aos anticorpos alvo nos eletrodos dos biossensores neste

trabalho como alternativa aos materiais tradicionais (carbono, ouro) com um apelo ambiental, pois o ZnO é biodegradável e o descarte seguro deve ser considerado.

1.2 Objetivos

Este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de detecção rápida de patógenos, especificamente a bactéria *S. aureus* [26-27]. Espera-se demonstrar ser possível a construção de dispositivos portáteis para a detecção de bactérias em um menor tempo possível para o controle do IRAS, durante o período de internação do paciente, e auxiliar na administração do tratamento antibiótico correto para ser aplicado o mais rápido, proporcionando um alívio do sofrimento do paciente e consequentemente sua rápida recuperação.

Analisar e aprofundar os estudos de espectrografia por fluorescência para complementar as metodologias já existentes e contribuir para os estudos de análise de imagens computacionais das aglutinações resultantes de uma reação entre antígeno-anticorpo (Ab-Ag) que possam ser enviadas para um dispositivo portátil de análises como, por exemplo, *smartphones*.

A pesquisa é considerada inovadora, pois há poucos estudos do uso de nanoestruturas utilizando o material ZnO para o desenvolvimento de imunossensores para a detecção rápida do *S. aureus*, foco desta pesquisa, como também aponta uma deficiência de estudos para a integração dos imunossensores como produto (*kit* de detecção portátil) para serem disponibilizados no mercado.

1.3 Estrutura do trabalho

A estrutura deste trabalho está organizada em 6 capítulos sendo o Capítulo 1 contendo a introdução e a relevância do estudo e como está inserido o problema no contexto atual na área médica hospitalar e a motivação para o desenvolvimento do trabalho, apresentando os detalhes e evidências para necessidade de uma nova metodologia de detecção rápida de patógenos.

O Capítulo 2 apresenta toda a parte conceitual, fornecendo a base teórica que fundamentam o trabalho para o desenvolvimento e compreensão dos estudos realizados durante

a pesquisa. É revisado brevemente os conceitos de infecções nosocomiais, fluorescência, biossensores, eletrodos, nanotecnologia e voltametria.

Uma seleção dos trabalhos mais relevantes na área é descrita e discutida no Capítulo 3, fazendo uma comparação das técnicas existentes hoje e os métodos estudados para a detecção rápida de patógenos. Ao final uma tabela comparativa é criada pelo autor.

O Capítulo 4 apresenta toda a metodologia utilizada na execução do experimento e descrevendo com detalhes os materiais utilizados e reagentes, obtenção das amostras de bactérias para o estudo e como foram resolvidas as dificuldades durante todo andamento da pesquisa, além dos equipamentos exigidos para realizar as medições eletroquímicas.

O Capítulo 5 descreve os resultados dos dados coletados durante as análises eletroquímicas e sua apresentação em formato de voltamogramas, imagens e as discussões de relevância desse trabalho de forma a contribuir com o problema.

Por fim, o Capítulo 6 aborda as conclusões do autor, perspectivas futuras do trabalho para a continuação do desenvolvimento da pesquisa.

Capítulo 2 - Fundamentação Teórica

Este capítulo visa apresentar a parte conceitual estudada para a realização de todo o desenvolvimento das técnicas utilizadas na pesquisa além de oferecer o entendimento necessário mínimo ao leitor para acompanhar o trabalho descrito nessa tese.

2.1 Infecções Nosocomiais

Em nossas mãos temos duas categorias de bactérias, as residentes e as transitórias. As colônias de bactérias transitórias são as mais suscetíveis à remoção pela lavagem das mãos, pois vivem na superfície da pele, mais especificamente na epiderme. São adquiridas por meio do contato direto com pessoas, pacientes e objetos contaminados e dependendo no número de micro-organismos e a umidade da pele, podem se tornar persistentes como, por exemplo o *Staphylococcus aureus*. Segundo estudo publicado no guia da OMS [28], outras bactérias como a *Enterococcus faecalis* sobreviveram por pelo menos 60 s nas pontas dos dedos das mãos com e sem luvas. A probabilidade da contaminação por profissionais de saúde na assistência ao levantar um paciente, medir sua temperatura ou pressão arterial e tocar em partes do corpo ao realizar algum procedimento médico, deve ser considerado.

O *S. aureus* é uma bactéria que pode sobreviver por mais de duas horas nas mãos e encontrada em até 78% dos profissionais de saúde, conforme os estudos científicos publicados por [8] ilustrado pela Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Frequência e permanência de patógenos nas mãos dos profissionais de saúde.
Fonte: Tabela adaptada de [8].

Patógenos	Causa frequente hospitalar	Frequência nas mãos	Permanência nas mãos (min)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecção do local cirúrgico, sepse por pneumonia.	10 – 78%	>= 150
<i>Pseudomonas spp.</i>	Infecção do trato respiratório inferior.	1 – 25%	30 – 180
<i>Escherichia coli</i>	Infecção do trato urinário.	Desconhecido	6 – 90

Leveduras incluindo <i>Candida spp.</i>	Infecção do trato respiratório inferior, infecção do trato urinário, sepse.	23 – 81%	60
Rotavírus	Gastroenterite viral, particularmente em crianças.	20 – 79%	> 240
<i>Clostridium difficile</i>	Diarreia associada a antibióticos.	14 – 59%	Desconhecido

A OMS estabelece diretrizes sobre a higienização das mãos que consiste em seis etapas para que todas as áreas das mãos sejam limpas [29]. Todas as etapas, ilustradas pela Figura 2.1 devem durar 42,5 s para garantir que as mãos estejam livres de germes. Esse procedimento deve ser seguido pelos profissionais de saúde a cada contato com o paciente para reduzir a probabilidade de infecções em ambientes hospitalares. Porém, de acordo com a pesquisa realizada na Universidade da Caledônia em Glasgow [30] revelou-se que 65% do total de 120 pessoas escolhidas entre médicos e enfermeiros completaram às seis etapas na totalidade mesmo sendo observados durante todo o tempo durante a realização do procedimento.



Figura 2.1 - Diretrizes sobre a higienização das mãos em 6 etapas. Fonte: Figura adaptada de [30].

2.2 Fluorescência

Podemos definir fluorescência como sendo a luminescência de uma cor visível emitida por uma substância a partir de sua estimulação ou excitação por uma radiação eletromagnética. Isso ocorre quando um feixe de luz ultravioleta excita um elétron e o seu estado é alterado de um nível baixo (fundamental) para um nível alto de energia ou excitação. Quando seu estado retorna ao nível baixo temo então a emissão de fluorescência. Essa mudança para um nível de energia mais alto podemos é conhecida com absorção [31-32]. O espectro de absorção é dependente do comprimento de onda de luz e esse valor é útil, pois através dele pode realizar a identificação e o mapeamento dos compostos.

A concentração da absorbância é medida através da aplicação da Lei de *Beer-Lambert* [33] descrita na equação 2.1:

$$A = \lambda . b . c \quad (2.1)$$

Onde A: absorbância medida, λ coeficiente de absortividade onde depende do comprimento de onda, b é o comprimento do caminho e c é a concentração do analito.

Chamamos emissão a volta dos altos níveis de excitação de energia para um nível mais baixo emitindo assim radiação (luminescência) e sua quantidade é linearmente proporcional a concentração do analito. A emissão de retorno pode descer em variados níveis a caminho do nível original, portanto, pode apresentar frequências diferentes [34]. Todo o ciclo é ilustrado na Figura 2.2.

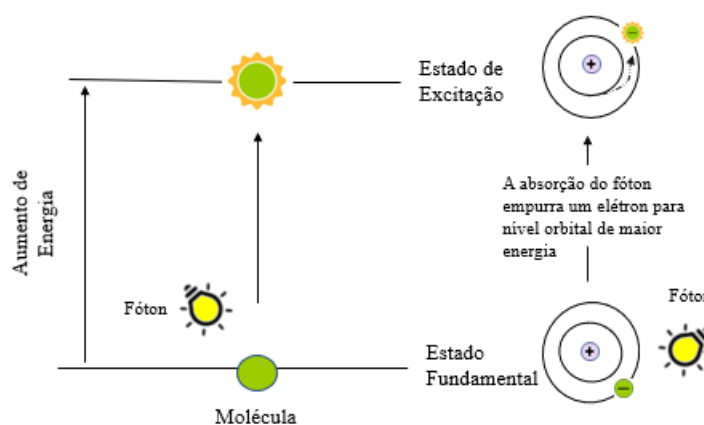


Figura 2.2 - Ilustração das alterações dos níveis de energia de emissão e excitação. Fonte: Figura adaptada de [34].

O espalhamento é outro fenômeno que podemos obter durante uma análise espectrográfica e acontece quando uma parte da radiação desvia do seu curso original para outras direções. Dentre as possibilidades de espalhamento o de *Ramam* é o mais conhecido, além dos de *Rayleigh* e *Brillouin* [35].

Os componentes chamados de fluoróforos são moléculas orgânicas que emitem radiação eletromagnética em um comprimento de onda maior, a partir de uma absorção na faixa de UV. Recebem a classificação intrínseca quando são nativos presentes em proteínas como o triptofano, fenilalanina e tirosina. Os fluoróforos extrínsecos são aqueles sendo adicionados aos compostos para serem detectados como sondas fluorescentes [36]

A espectroscopia de fluorescência é utilizada como instrumento de análise em áreas das ciências biológicas, por serem uma prática rápida de diagnóstico em tempo real de superfícies inconsistentes em objetos e principalmente na análise de substâncias contaminantes [37-38]. Essa análise é possível utilizando dispositivos como fluorímetros, calorímetros, espectrofotômetros, porém a dependência do uso de microscópios de grande porte e custo elevado é uma barreira para o avanço da técnica e a aproximação do paciente.

Os diferentes comprimentos de ondas formam o que conhecemos por espectro luminoso é o intervalo de todas as frequências e ondas eletromagnéticas, ilustrando conforme a Figura 2.3, apenas a faixa da radiação gama até as ondas de rádio.

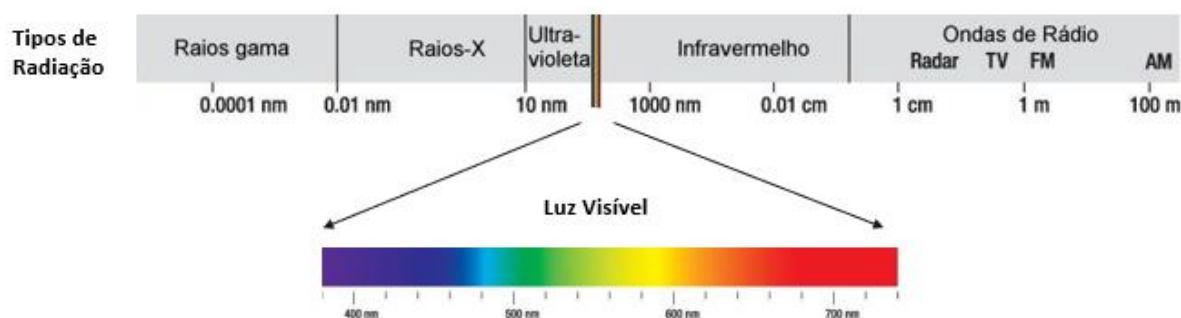


Figura 2.3 - Espectro luminoso com os tipos de radiações e comprimentos das ondas eletromagnéticas. Fonte: Figura adaptada de [34].

Algumas fontes de luz podem ser utilizadas como excitação como lâmpadas, *lasers*, lâmpadas de vapor de mercúrio ou xenônio e micro LED UV. Essas luzes podem ser adquiridas

em lojas de eletrônica, supermercados e podem servir para alguns experimentos. Porém, uma desvantagem é que os comprimentos de onda de um LED, por exemplo, não podem ser alterados e dependendo do objetivo da pesquisa, podem ser requeridas várias lâmpadas como fontes de emissões para poderem ser chaveadas. A Figura 2.4 mostram 3 luzes ultravioleta: uma lâmpada negra UV-A, 25W - 380 nm (a), uma lâmpada UV-C, 9W - 254 nm (b) e um LED UV-A, 3W - 395 ~ 400 nm (c).

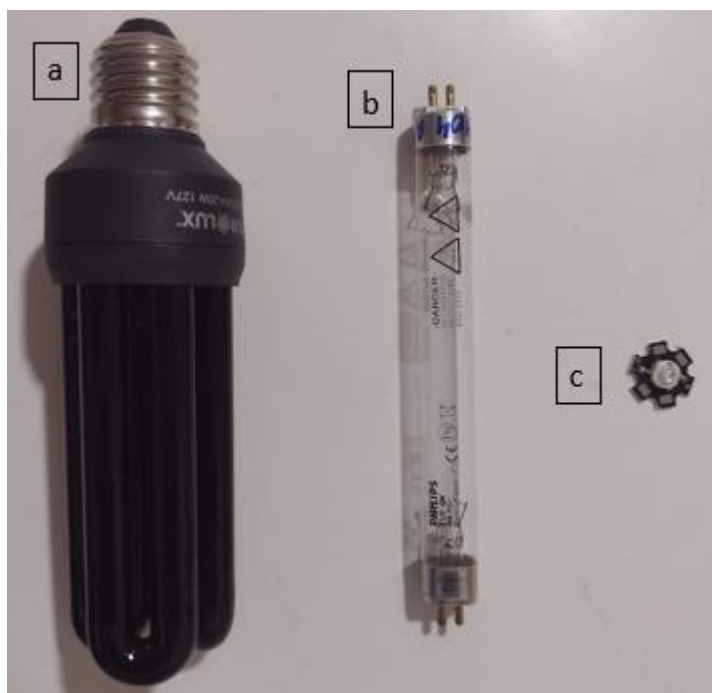


Figura 2.4 - Figura de 3 fontes de luzes UV. Lâmpada de Luz Negra (a), Lâmpada UV-C (b) e LED UV-A (c). Fonte: Própria (2021).

2.3 Biossensores

O estudo dos biossensores tem seu início registrado na literatura a partir de 1962. A ideia dos pioneiros Clark e Lions [39] fez tanto sucesso que hoje os medidores portáteis de glicose no sangue, que podem ser operados pelo próprio usuário de maneira prática, é o melhor exemplo dos benefícios do uso de biossensores no tratamento de doenças, como neste caso, a diabetes.

Um biossensor tem como característica ser um dispositivo capaz de detectar moléculas biológicas de um analito alvo e geram sinais elétricos dependendo das concentrações dos compostos químicos [40-41]. Os processos de reconhecimentos biológicos que podem ser enzimas, proteínas, anticorpos, DNA, tem a propriedade de interagir com o alvo que deseja

detectar e que resulta em mudanças físico-químicas que possam servir como medidas por um transdutor.

O transdutor [42-43] é o componente responsável por converter a resposta biológica em um sinal elétrico útil normalmente proporcional a quantidade do elemento biológico a ser detectado. Deve ser considerado para a escolha dos transdutores a sua especificidade e a capacidade de imobilização do material biológico na superfície. Dentre os mais comuns podemos classificar em: eletroquímicos (amperimétricos, impedimétricos, potenciométricos), ópticos (colorimétricos, fluorescentes), calorimétricos (temperatura) e piezoelétricos (massa).

E por fim o sistema de processamento que apresenta o sinal de saída para ser amplificada, visualizada e armazenada [44]. Com o avanço da tecnologia hoje podemos facilmente transportar o processamento dessa etapa para um *smartphone* para que o conjunto que envolve todos os componentes de um biossensor possa ser utilizado em campo ou em pontos de atendimento móvel, dispensando o uso em laboratórios específicos ou se prendendo em equipamentos de bancada. A Figura 2.5 ilustra os componentes de um biossensor envolvidos em uma medição eletroquímica.

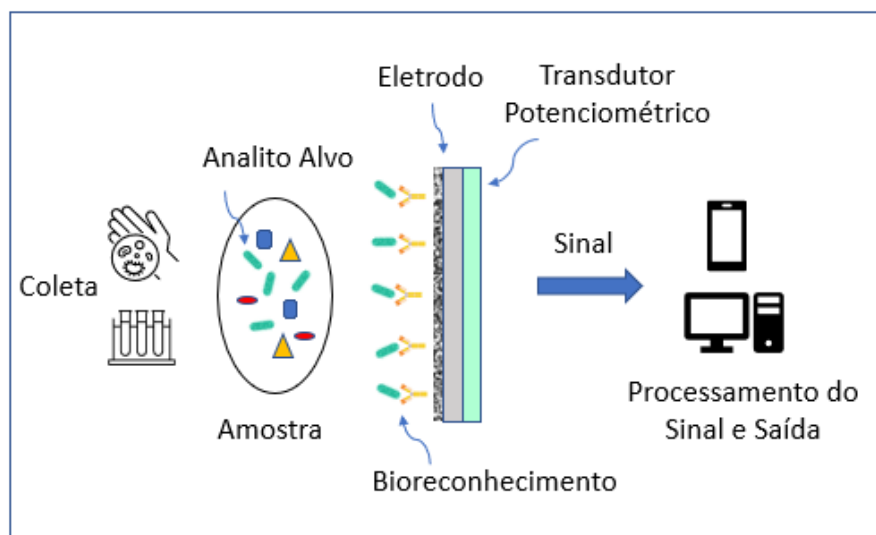


Figura 2.5 - Componentes típicos de um imunossensor desde a coleta, reconhecimento biológico e o processamento do sinal. Fonte: Figura adaptada de [44].

Alguns parâmetros analíticos são necessários e importantes para a segurança e validação de um biossensor como, por exemplo: linearidade, seletividade, especificidade, limite de detecção, repetitividade e reprodutibilidade. A linearidade pode ser visualizada através de

gráficos e demonstra a proporcionalidade entre a resposta obtida e a concentração do analito alvo. A seletividade é um parâmetro importante, pois em um experimento onde temos vários analitos é necessário a distinção entre eles. Já a especificidade responde apenas a um analito específico durante o processo de detecção [45-46]. Os parâmetros de repetitividade e reprodutibilidade se relaciona com índices de exatidão do biossensores. A repetitividade aborda várias medições e análise dos dados a partir de um mesmo dispositivo e local em curtos espaços de tempo. A reprodutibilidade busca o desempenho do método sob condições variáveis de medição laboratoriais diferentes.

Outros requisitos são desejáveis para demonstrar sua viabilidade operacional e técnica como, por exemplo o custo, compreendendo todos os materiais e reagentes utilizados durante o processo de fabricação, o tamanho e seu peso, que interfere na praticidade e mobilidade do dispositivo e a interface com o usuário, para tornar os sistemas automáticos, simples e requer pouco conhecimento técnico do usuário.

A aplicação dos biossensores podem ocorrer em várias áreas científicas como em controle de bioprocessos, incluindo empresas alimentícias, onde os processos tradicionais de detecção de contaminação são caros e demorados [47-48]. Outra aplicação é na área ambiental onde os biossensores podem ser requisitados para o controle de poluentes no ar, solo, água ou em situações extremas como uma guerra biológica e terrorismo.

O avanço da tecnologia nos permite hoje a integração de eletrodos imunossensores com *smartphones* para análise tanto qualitativa como quantitativa. De fácil uso e acessíveis, temos equipamentos com conexão à rede wi-fi padrão IEEE 802.11, *Bluetooth*, 4G, câmeras de alta resolução com alto poder de processamento e memória. É uma área ainda a ser bem explorada e os estudos têm aproximado cada vez mais os dispositivos ao ambiente do paciente como objeto de monitoramento e auxílio no controle da saúde. No Capítulo 3 serão abordados alguns trabalhos relacionados ao tema e suas respectivas referências.

2.4 Eletrodos

Os eletrodos impressos SPE (*Screen-printing Electrode*) [49], são regiões (trilhas) nas placas sensoras onde ocorrem as reações de óxido-redução nos eletrodos de anodo e catodo. Podem ser construídos em substratos de cerâmica, plástico ou papel e tem como características principais o custo, fabricação em larga escala, portátil e de análise rápida.

A diferença de potencial entre os eletrodos causa uma transferência de elétrons espontânea ou forçada quando seus circuitos são fechados através da aplicação de uma ponte salina ou membrana semipermeáveis. Durante um ensaio eletroquímico são utilizados três eletrodos que são confeccionados juntos em uma única base sensora: o de trabalho WE (*Working Electrode*) exercendo a função de catodo, o de referência RE (*Reference Electrode*) como anodo, e o auxiliar ou contra eletrodo CE (*Counter/Auxiliary Electrode*) [43][50]. No eletrodo de trabalho são normalmente utilizados materiais condutores como: ouro, prata e principalmente a base de carbono, devido a sua versatilidade e abundância. A Figura 2.6 ilustra a disposição de cada um dos eletrodos.

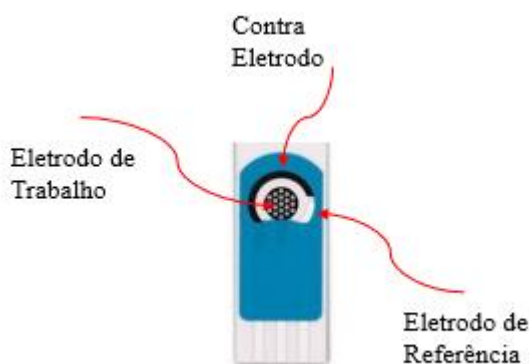


Figura 2.6 - Ilustração de uma base sensora em cerâmica com a identificação de cada um dos 3 eletrodos. Fonte: Figura adaptada de Metrohm (2021).

2.5 Nanomateriais

Um número crescente de publicações sobre o uso de materiais em escala nanométrica (1-100 nm) tem sido pesquisado visando melhorar a sensibilidade e estabilidade das moléculas biológicas nos eletrodos. Diferentes nanomateriais surgem como tecnologia promissora e vem sendo testados como, por exemplo: nanofios, nanotubos, nanobastões de carbono e grafeno, atuando na aceleração da transferência de elétrons levando a uma reposta rápida da corrente elétrica [51].

Dentre as aplicações o seu uso na área médica para a criação de biossensores para o diagnóstico precoce em nano escala tem um potencial promissor e atrai a atenção de pesquisadores [52-54].

Um material objeto de estudo e utilizado neste trabalho é o óxido de zinco (ZnO) de fácil manipulação e cristalização e com características morfológicas que atende hoje várias aplicações como na área de cosméticos, eletrônica, borrachas. Possui uma boa estabilidade química o que favorece a imobilização de anticorpos, enzimas e proteínas. É um semicondutor o que a torna um excelente facilitador na troca de elétrons durante o processo de óxido-redução. Existem uma diversidade de técnicas para o crescimento de nanopartículas de ZnO entre algumas: precipitação em solução aquosa, síntese hidrotérmica, precipitação e decomposição de vapor em que permitem a criação em vários tamanhos e formas [55-56]

Quando cristalizado [57] apresenta uma base em formato hexagonal com dimensões aproximadas entre 60-110 nm. A Figura 2.7 mostra os nanobastões de ZnO com ampliação de 100 kx. É possível visualizar as formações de nanoestruturas do tipo bastão [58-59].

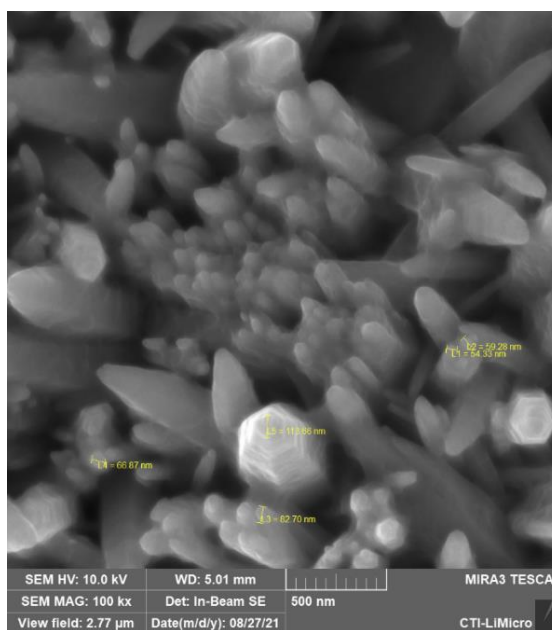


Figura 2.7 - Imagem por MEV dos nanobastões de ZnO crescidos na base sensora e ampliados a 100 kx. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).

2.6 Voltametria Cíclica e de Pulso Diferencial

A voltametria cíclica CV (*cyclic voltammetry*) é uma das medições eletroquímicas rápidas possíveis permite que se tenha informações de transferências de carga dos eletrodos, para realizar análises qualitativas. As medições são obtidas através de um aparelho chamado potenciostato que se conecta aos eletrodos por alguma interface e aplica uma variação de potencial linear controlado crescente até um valor máximo e em seguida inverte seu valor de forma decrescente até um nível mínimo no eletrodo de trabalho [50]. Nessa medição a corrente resultante é registrada durante as reações de óxido-redução. Todo o processo é representado por picos de corrente anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) em uma representação gráfica da corrente em função do potencial onde chamamos de voltamograma [60], conforme ilustra a Figura 2.8.

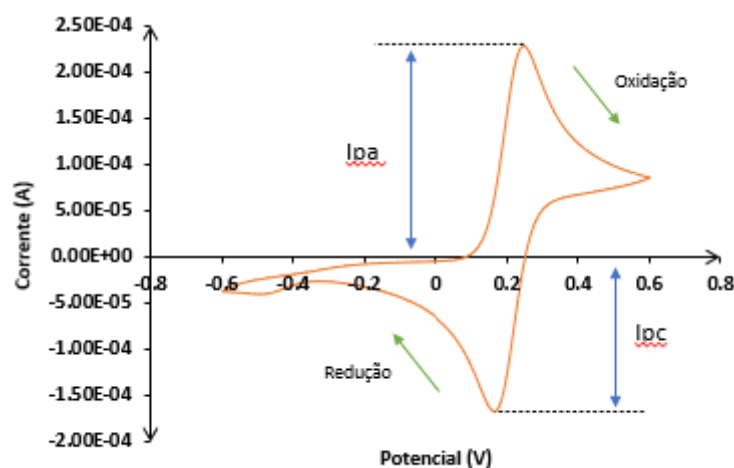


Figura 2.8 - Voltamograma representando uma medição CV e as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}). Fonte: Própria (2021).

Outra medição possível de ser realizada a partir do potenciostato é a voltametria de pulso diferencial DPV (*differential pulse voltammetry*), que aplica um potencial linear com medições de corrente antes e ao final dos pulsos de mesma amplitude (10 a 100 mV) em um intervalo muito curto [61]. Essa técnica é utilizada quando se deseja obter uma melhor sensibilidade e o resultado é apresentado em forma de uma curva gaussiana conforme Figura 2.9.

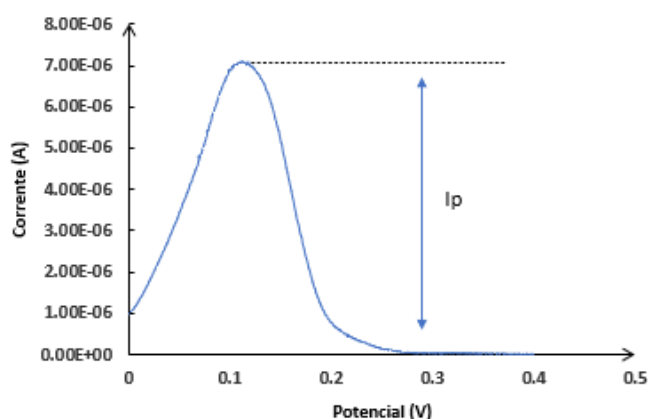


Figura 2.9 - Voltamograma representando uma medição DPV e a corrente de pico (I_p). Fonte: Própria (2021).

A categoria de material utilizado e as propriedades físico-químicas do eletrodo de trabalho (WE) escolhido para os ensaios e o crescimento dos nanobastões tem grande influência nos valores de leitura do procedimento voltamétrico e de todo registro eletroquímico que ocorre durante a transferência de elétrons.

O desenvolvimento de potenciostatos experimentais de valor acessível é possível hoje em dia devido à facilidade do uso de microprocessadores em plataformas como Arduino², Raspberry Pi³. No caso da Raspberry Pi a plataforma pode suportar instalações dos sistemas operacionais Windows e Linux, além de suportar a linguagem de programação Python, essencial hoje para o desenvolvimento de programas que facilitem o envio e o recebimento de dados em dispositivos IoT (*Internet of Things*).

Um dos exemplos é o projeto JUAMI [62], desenvolvido por pesquisadores das Universidades da África para que experimentos eletroquímicos fossem realizados em ambientes com recursos limitados. O dispositivo é baseado no Arduino Uno com uma placa de circuito impresso e um microcontrolador e componentes eletrônicos. O valor de mercado de um Arduino é de US \$ 12,00 e o total de componentes eletrônicos, placas e microcontrolador é estimado em US \$ 27,00.

Utilizando uma interface gráfica GUI (*Graphical User Interface*), gerado pelo software LabView⁴, é possível realizar diferentes medidas de voltametria cíclica para o

² <https://www.arduino.cc/>

³ <https://www.raspberrypi.com/>

⁴ <https://www.ni.com/pt-br/shop/labview.html>

aprendizado rápido como alternativa ao uso de potenciostato comerciais e de grande porte. A Figura 2.10 mostra a montagem do projeto JUAMI realizado pelo próprio autor para estudar os resultados das medições eletroquímicas, porém não foram utilizados nos ensaios deste trabalho.

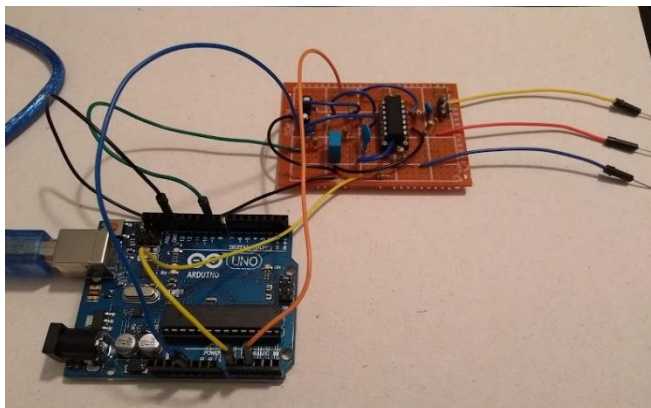


Figura 2.10 - Montagem de um potenciostato experimental utilizando o Arduino (Projeto JUAMI). Fonte: Própria (2021).

2.7 Aglutinações

Uma reação de aglutinação ocorre quando um anticorpo se liga com outras células ou partículas (antígenos) em uma solução conforme ilustração da Figura 2.11. Durante a aglutinação as moléculas dos anticorpos podem se ligar a dois ou mais antígenos presentes na amostra formando uma massa de aglutinação que pode tornar-se visível a olho nu ou com auxílio de lentes e pode ocorrer em questão de minutos ou horas. Esse fenômeno é alvo de estudos futuros de grande potencial quando se combinam com a metodologia de imunossensores e fluorescência para uma possível análise de imagem computacional [63-65]

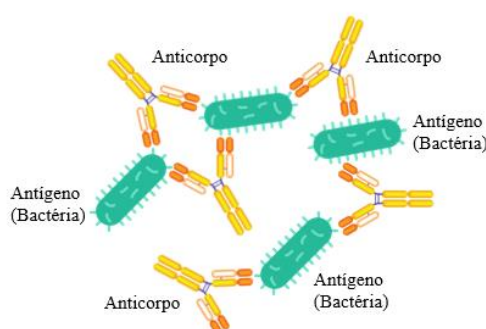


Figura 2.11 - Ilustração de aglutinações entre anticorpos e antígenos (Ab-Ag). Fonte: Própria (2021).

Capítulo 3 - Trabalhos Relacionados

Para monitorar a qualidade das lavagens das mãos, uma pesquisa realizada por [66] propôs o uso de sensores para medir as posições das mãos e os gestos obtidos por câmeras classificando e medindo o tempo gasto em cada uma das 6 etapas de lavagem das mãos. Através de algoritmos de visão computacional foi possível classificar e identificar as poses das mãos, quando unidas ou separadas, tendo como resultados uma variação de 85,95% a 97,81% nas taxas de acurácia. O custo dos sensores, câmeras, do processamento computacional em tempo real e identificação das imagens das poses é uma barreira que deve ser superada para o uso em ambientes hospitalares.

Alcançar uma maior conformidade com a higiene das mãos é um desafio cada vez mais distante da realidade, devido a fatores, como: esquecimento, falta de materiais, baixa adesão dos profissionais de saúde. Visando contribuir para o aumento da conformidade, um sistema de lembrete de lavagem das mãos foi desenvolvido por [67] em conjunto com um relógio inteligente que monitora também os gestos realizados e a duração da lavagem. Apesar de o dispositivo conseguir uma precisão média de 88% na identificação dos gestos durante a lavagem das mãos de outros gestos, a solução esbarra pela proibição de seu uso em ambientes de preparação cirúrgica, além de poder, abrigar germes e necessitar também de higienização. Não há estudos na eficácia do protótipo em ambientes reais hospitalares e nem seu grau de aceitação pelos profissionais de saúde.

Outros métodos de forma a monitorar a conformidade durante as lavagens das mãos foram objetos de estudos na Universidade de Ottawa no Canadá [68] na implantação de sistemas de localização em tempo real dos profissionais de saúde com dispensadores automáticos de produto desinfetante para as mãos. Notificações personalizadas são enviadas quando não são executadas ações de higiene nas mãos, durante a movimentação dos profissionais entre pacientes de um mesmo quarto. O sistema também lembra o profissional quando ele entra em uma área onde o procedimento de higienizar as mãos não foram realizadas, registrando no dispensador automático a liberação do sabonete ou álcool gel, acionado através da transmissão de sinais infravermelhos e computados no crachá do profissional, onde a informação é visualizada por meio de um LED. O ambiente utilizado nesse estudo foi simulado no Hospital da Universidade de Ottawa onde constatou a necessidade constante de troca das baterias dos dispensadores, além de uma ampla estrutura de cobertura da rede sem fio para o monitoramento

e rastreamento dos profissionais de saúde. Um cuidado é necessário com os dados privados e a localização dos profissionais, que devem ser manipulados de maneira a obedecer às leis de privacidade de dados pessoais de cada país.

Enquanto o uso de dispensadores com álcool, por exemplo, facilita o ato de higienização das mãos, dados preliminares demonstram uma melhor conformidade na pesquisa realizada por [69], mas podem causar secura na pele e irritação, indicado para os casos quando as mãos não estão visivelmente sujas. Segundo os autores da pesquisa, a conformidade melhorou significativamente com a introdução de procedimentos de esfregar as mãos com ajuda dos dispensadores em vez de lavar as mãos, devido ao menor tempo gasto para atingir o procedimento das 6 etapas, muitas vezes não completadas com sucesso. Estudos clínicos realizados no Hospital Universitário da Basileia, Suíça, por [69] indicam que a lavagem com sabão foi insuficiente para erradicar a bactéria *S. aureus* e nem sempre é eficaz para impedir a transmissão cruzada, devendo ser introduzido à solução compostos alcoólicos para aumentar a eliminação de bactérias resistentes. Portanto, o uso das duas técnicas deve ser considerado, principalmente pela facilidade de se terem dispensadores ao lado de pacientes, salas de atendimentos e de uso rápido, economizando tempo de trabalho. A Tabela 3.1 faz uma comparação entre o uso de sabão, de uma substância que contenha clorexidina e com uma solução alcoólica para a lavagem das mãos.

Tabela 3. 1 - Comparação entre os agentes sabão, clorexidina e álcool para lavagem das mãos e suas características. Fonte: Tabela adaptada de [69].

Características	Sabão	Clorexidina	Álcool
Remoção de sujeiras	Sim	Sim	Não
Tempo estimado do procedimento	1 – 2 min	1 – 2 min	30 s
Possibilidade de trabalhar durante o procedimento	Não	Não	Sim, em parte.
Risco de recontaminação por água/torneira	Sim	Sim	Não
Risco de contaminação durante a lavagem das mãos	Sim	Sim	Não
Acessibilidade	Limitado	Limitado	Ilimitado
Localização	Na pia	Na pia	Qualquer lugar

Conformidade < 40%	Raro	Raro	Provável, mas limitado.
Necessidade de toalha para secagem	Sim	Sim	Não
Inflamável	Não	Não	Sim, depende do ponto de combustão.

A norma europeia recomenda o uso de 3 mL de solução alcoólica suficiente para ser esfregada nas mãos, enquanto a OMS diz que o volume deve ser suficiente para cobrir todas as superfícies das mãos. A pesquisa realizada por [70] usa uma conferência internacional onde os visitantes foram convidados para realizarem a lavagem das mãos com diferentes volumes de solução alcoólica de 1, 2 e 3 mL, cobrindo tanto a palma da mão como também o dorso. Um produto rastreador ou marcador foi utilizado para analisar a cobertura do produto nas mãos que em conjunto com uma luz ultravioleta selecionou os voluntários que alcançaram no mínimo 90% de área coberta. Como resultado, o volume de 3 mL de solução não cobriu totalmente a palma e o dorso de mãos consideradas grandes e o volume de 1 mL não é suficiente para cobrir as palmas e pontas dos dedos, onde o dorso inclusive não é completamente coberto. O tempo de contato também foi uma variável analisada e não deve ficar abaixo de 10 a 15 s, pois o álcool evapora rapidamente, tornando-se a higienização ineficaz.

O ensino e treinamento dos profissionais de saúde de como realizar o procedimento das 6 etapas corretamente é crucial para a diminuição dos casos de infecções cruzadas hospitalares. Para o apoio ao aprendizado, a existência de marcadores em formato líquido ou em pó são utilizados com a ajuda de uma luz ultravioleta, que ao incidir na mão a ser monitorada reflete as áreas que não foram bem lavadas. O *kit Glo Germ* é um deles e consegue demonstrar em uma simulação como funciona a transmissão e a contaminação cruzada através da fluorescência, deixando rastros marcando com o gel nas mãos, parte dos corpos dos pacientes, objetos e instrumentos médicos. A Figura 3.1 mostra a aplicação do produto nas mãos ao incidir uma luz UV-A.



Figura 3.1 - Mão do autor com a aplicação do gel Glo Germ e sua fluorescência ao incidir uma luz UV-A. Fonte: Própria (2021).

O conhecimento hoje a respeito do uso da radiação no espectro ultravioleta não se restringe apenas aos seus efeitos biológicos benéficos como a produção de vitamina D no nosso organismo, mas também sua ação germicida, muito utilizada na desinfecção intra-hospitalar [71]. Segundo estudos por [72] um experimento foi realizado para determinar o tempo e a distância ideal de exposição de uma fonte de luz germicida (UV-C) a um conjunto de bactérias mais comuns encontradas em ambientes hospitalares como, por exemplo, o *E. coli*. O resultado sugeriu uma eficácia na inatividade bacteriana a uma distância de 3 metros de uma fonte de luz germicida com um tempo de exposição de 30 minutos. Por outro lado, a radiação UV é o principal agente no desenvolvimento de câncer de pele, causando mutações genéticas no DNA, envelhecimento da pele e queimações do tecido cutâneo, conforme o estudo realizado por [73] o que inviabiliza o uso de dispositivos de higienização das mãos utilizando dispositivos com luzes de radiação no espectro UV-B (320 - 280 nm) e UV-C (280 - 100 nm).

Um controle automático para analisar a qualidade das lavagens das mãos foi estudo de um trabalho realizado por [74] ao desenvolver um aparelho móvel chamado *Stery Hand*. Por meio de algoritmos de visão computacional OpenCV (*Open Source Computer Vision Library*) e segmentação das imagens fotografada de 44 mãos submetidas a luz ultravioleta, após a lavagem das mãos com o marcador e sua posterior secagem, conseguiu-se identificar as áreas limpas a uma taxa de 88% de sucesso. Por utilizarem a luz ultravioleta com o comprimento de onda de 254 nm (UV-C) o uso do equipamento deve ser avaliado, pelo fato de causarem a longo prazo câncer de pele e danos aos olhos conforme o tempo de exposição [75], podendo ser uma barreira para a aceitação do dispositivo ou gerar ainda desconfiança no seu uso diário.

Outra pesquisa realizada com 25 modelos artificiais da palma das mãos que, inicialmente, foram cobertas de forma proposital com *Staphylococcus epidermidis*. Em seguida, foram descontaminadas entre 10% e 25% da área total em áreas específicas. Usando as imagens de uma luz UV pareadas com análises microbiológicas dos modelos, foi possível obter uma grande acurácia (sensibilidade 95,05% e especificidade 98,01%) das áreas marcadas com UV comparando com as áreas descontaminadas, demonstrando diretamente o emprego da luz UV como indicador da correta higienização das mãos [76].

A aplicabilidade do uso da luz UV a torna de extrema importância, mesmo em grupos de profissionais que utilizam a sequência de lavagem das mãos preconizada pela OMS, como demonstrada por [77] em que apenas 67 dos 705 participantes (9,5%), permaneceram isentos de contaminação após avaliação das mãos utilizando a luz UV como monitoramento, demonstrando a sensibilidade de tal prática.

As pesquisas têm avançado no desenvolvimento de dispositivos para prevenir infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS). Equipamentos para desinfecções de superfícies de objetos, materiais cirúrgicos e até salas inteiras de cirurgia são desenvolvidos utilizando a radiação UV-C de forma satisfatória como mostra a pesquisa realizada por [78] onde um dispositivo portátil conseguiu reduzir em 90% uma cultura de bactérias preparadas e aplicadas em um ambiente hospitalar. Ainda demonstrou ser uma alternativa viável em superfícies que não podem ser desinfetadas com produtos químicos. Em outra pesquisa realizada na Universidade de Yale em conjunto com o Hospital Escola Saint Raphael [79] foi utilizada uma unidade móvel automática que emite radiação UV-C em 20 salas de pacientes após a alta hospitalar. Houve uma redução na contagem das colônias de bactérias existentes (90%) nas superfícies diretamente expostas antes do uso do equipamento móvel em comparação com a quantidade encontrada (47%) após a emissão da luz UV-C.

Os estudos com relação ao uso da luz ultravioleta (UV-C) em objetos e superfícies, discutidos até então demonstram a capacidade de eliminar vírus e bactérias. Estima-se que o vírus Sars-CoV-2 possa sobreviver em superfícies por até 9 dias e mesmo ainda em testes, sua inativação por luz UV-C possa seguir o mesmo comportamento de outros coronavírus similares como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), onde foram comprovadas sua eficácia, servindo assim como estratégia de combate a transmissão da doença [80].

Os estudos na área da espectrografia por fluorescência mostram que a técnica é uma ferramenta possível para diagnósticos da presença de bactérias, fungos e vírus. Dados de pesquisas realizadas por [73] indicam que o método é uma ferramenta não invasiva onde algumas bactérias como, por exemplo, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, puderam ser rapidamente diagnosticadas com sensibilidade de 90%. O método proporciona uma economia de tempo entre 18 e 24 horas eliminando a necessidade da realização de meios de cultura em laboratórios.

A existência da propriedade de autofluorescência em muitas bactérias faz com que seja possível sua classificação em gênero, espécie e grupo, pelo uso de impressões digitais espectrais. Uma substância com propriedades fluorescentes é o *Tryptophan*, aminoácido presentes em vírus e bactérias que ao ser excitado a partir da emissão de luz UV com pico máximo de 280 nm emite uma fluorescência com um comprimento de onda de 350 nm [81]. Essa propriedade tornam a análise por espectrografia uma excelente ferramenta na detecção de patógenos e requer baixas concentrações de amostras, conforme aponta [82] em concluir ser uma técnica promissora e de processamento rápido dos dados.

O estudo das impressões digitais espectrais para a detecção, diferenciação e caracterização de bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, e *Staphylococcus epidermidis*, foi explorado na pesquisa realizada por [83] utilizando o método da espectrografia por fluorescência e a propriedade autofluorescente do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAPDH) que age como um marcador fluoróforo intrínseco (*label free*), reforçando ser uma técnica de análise de imagem valiosa e não invasiva para estudar o metabolismo e o comportamento bacteriano.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno presente nos seres humanos que podem infectar o sangue, a pele, os ossos, os ouvidos, os olhos, as vias urinárias, as válvulas cardíacas e os pulmões, excreta um composto extracelular chamado *Pyoverdine* que possuem características fluorescentes quatro vezes mais intenso que o *Tryptophan*. Quando excitado por uma luz UV a 395 nm, emite uma fluorescência com pico em 455 nm, segundo aponta [84] que corresponde ao espectro de luz visível pelos seres humanos, que varia entre 400 e 750 nm e pode ser capturada facilmente por dispositivos de análise de imagens.

A aproximação de dispositivos leves, portáteis para serem integrados na rotina dos profissionais de saúde, como, por exemplo, câmeras digitais, *smartphones* e placas eletrônicas computadorizadas de tamanho reduzido (Arduíno e Raspberry) e possam ser ágeis na detecção

de bactérias e vírus é inevitável com o avanço da tecnologia junto a evolução da ciência. Câmeras com resoluções maiores que 20 megapixels e o aumento do poder de processamento gráfico GPU (*Graphics Processing Unit*) permite a análise de imagens em tempo real. A possibilidade da acoplagem de vários dispositivos na interface micro USB, disponíveis nos *smartphones* atuais, proporciona uma gama de opções em potencial que podem ser desenvolvidos, como a acoplagem de biossensores e espectrômetros de tamanho reduzido para análise de fluorescências, reflectâncias e luminescências, conforme mostra o estudo realizado por [85].

A construção de espectrômetros com câmeras digitais utilizando materiais simples como o papelão e um DVD realizado por pesquisadores da Faculdade de Matemática e Ciências Naturais da Indonésia [86] demonstraram na prática a viabilidade da construção de um dispositivo básico para o ensino do espectro luminoso em sala de aula e em laboratórios em substituição a espectrômetros industriais.

A facilidade da acoplagem de *smartphones* com um *hardware* externo para aquisição de dados tem servido como uma ferramenta econômica de diagnóstico e triagem de doenças hematológicas e infecciosas em países onde equipamentos de laboratórios como microscópios são escassos. Foram abordados no trabalho realizado por [87] a captação de imagens utilizando a câmera de *smartphones* para análise do espectro luminoso do globo ocular de pacientes em campo em busca de pessoas que possam apresentar sintomas como glaucoma, malária e hipertensão. A pesquisa também mostra o crescimento de artigos com a combinação das palavras *smartphones* e espectrômetro de 2014 a 2017 segundo a *Science Citation Index Expanded* (SCIE) e a potencial aplicabilidade em outras áreas incluindo a agricultura, inspeção para o controle de alimentos contaminados, análise atmosférica e química analítica.

A maioria dos estudos na adaptação de *smartphones* para trabalhar como espectrômetro se baseiam em projetos de medições em um único canal, onde apenas uma amostra pode monitorada. Com o trabalho realizado por [88] foi possível demonstrar através de um *smartphone* iPhone 5 uma análise óptica multicanal (8 canais) de alto rendimento sendo os resultados medidos comparados com os lidos por um espectrômetro de laboratório comercial e forneceram fortes evidências de que o dispositivo pode executar diagnósticos de alto rendimento, precisão e a alta sensibilidade.

Métodos convencionais para o diagnóstico da presença de bactérias são processos que consomem tempo de laboratório e levam dias para se ter um resultado. Podem ser citados

como exemplo o PCR (Polimerase *Chain Reaction*) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que apresentam a necessidade do uso de instrumentos industriais, equipes bem treinadas, sendo o resultado entregue em algumas horas ou dias, pois requerem um período de espera para a finalização da reação enzimática [89]. Dependendo da gravidade das infecções bacterianas isso é inaceitável e se faz necessário um diagnóstico rápido e preciso. A importância de um teste rápido durante a triagem dos pacientes serve também para que o tratamento antibiótico adequado seja iniciado o quanto antes e a identificação da fonte infecciosa seja localizada.

A introdução do conceito de biossensores na busca de métodos que auxiliem o diagnóstico de infecções bacterianas ou virais e a produção de artigos e publicações utilizando-se como palavras chaves o nome biossensores e em particular a nanotecnologia aplicada à área da saúde tem crescido 30% entre os anos de 2013 e 2018 [90]. Seu funcionamento básico consiste na combinação de componentes biológicos como ilustrado na Figura 2.5. Os biossensores têm sido amplamente utilizados como um método rápido, com alta sensibilidade para o diagnóstico e identificação de bactérias e vírus no corpo humano e em objetos [91].

A bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina é uma das bactérias mais comuns em hospitais com altas taxas de mortalidade [92]. Estudos no desenvolvimento de biossensores de papéis pelos pesquisadores [92] serviram para detectar uma quantidade pequena de unidades formadoras de colônia de bactérias de 7, 40 e 100 UFC.mL⁻¹ em alimentos como carne moída, leite e alface. Os resultados apresentados, visíveis a olho nu, foram quantificados por meio do uso de *softwares* de análise de imagens, apresentando os resultados em questão de minutos.

A análise mais profunda sobre o uso de *smartphones* acoplados a dispositivos analíticos e biossensores realizada por [93] demonstra, na maioria dos estudos, uma abordagem de prova de conceito em laboratórios e não em aplicações reais como dispositivos médicos. As tecnologias que utilizam as câmeras dos *smartphones* como um sistema detector colorimétrico, já são patenteadas por empresas como *Samsung* e *Apple*, porém o assunto é visto como um grande potencial no desenvolvimento futuro de auto medidores em tempo real semelhante aos existentes atualmente como os medidores portáteis de glicose no sangue.

A busca pela miniaturização de biossensores e transdutores como instrumento de leitura de dados e detecções em tempo real de amostras clínicas avança com ajuda da nanotecnologia na elaboração de componentes e matrizes sensíveis para detecção de patógenos. Com a acoplagem ou não de lentes, o trabalho realizado por [94] demonstrou a versatilidade

dos *smartphones* disponíveis no mercado transformando-o em um espectrômetro para a detecção de marcadores fluorescentes presentes no DNA, vírus e em nanopartículas. Ainda a pesquisa mostra a possibilidade do uso dos *smartphones* como biossensor colorimétrico, de ressonância de plasma de superfície SPR (*Surface Plasmon Resonance*) e eletroquímico, podendo ser acoplado um potenciostato para medição do diferencial elétrico produzido durante uma reação química e, posteriormente, a análise dos resultados.

Em 2018, XU, D., *et al.*, [95] aborda o *smartphone* como uma plataforma médica completa para diagnósticos rápidos de análises de amostras de DNA, vírus e bactérias, como alternativa a instrumentos biomédicos convencionais, não portáteis e de grande volume que demanda de treinamento e operacionalidade de profissionais qualificados. Explora ainda a capacidade dos *smartphones* de se comunicarem com biossensores eletroquímicos que utilizam a tecnologia NFC (*Near Field Communication*) e de aproximação através de uma etiqueta passiva RFID (*Radio Frequency Identification*). Os benefícios na utilização de redes sem fio para a transmissão dos resultados da análise facilitam a integração com dispositivos e aplicações de maneira a enviarem para o servidor conectado à Internet os dados a serem compartilhados de forma pública ou de acesso restrito.

Em 2019, MATHELIÉ-GUINLET *et al.*, [96] comenta sobre as técnicas tradicionais de detecção de bactérias que se baseiam na cultura e contagem de colônias e tendem a serem trabalhosas e demoradas. Um desenvolvimento rápido e crescente no uso de nanopartículas NPs (*nanoparticles*) como, por exemplo, o ouro (Au) ou óxido de ferro (Fe₂O₃) e anticorpos na produção de biossensores é visto como uma ferramenta promissora na procura de métodos para o diagnóstico de infecções bacterianas a serem aplicados no contexto hospitalar, alimentar e ambiental. Os estudos de MATHELIÉ-GUINLET *et al.*, [96] demonstraram a detecção da bactéria *E. coli* em diferentes tempos de 5, 15 e 30 min conforme a variação da quantidade de unidade formadores de colônia UFC.mL⁻¹.

Ainda no ano de 2019, LEE, C. W. *et al.*, [97] reforça a necessidade do diagnóstico rápido de infecções bacterianas na circulação sanguínea para elevar a taxa de sobrevivência e a aplicar o tratamento antibiótico correto. O uso de nanopartículas de ouro novamente é conjugado com um sistema micro fluídico portátil para aumentar o sinal das bactérias marcadas com anticorpos para poder ser detectado de forma rápida e ultrasensível. No estudo realizado o biossensor eletroquímico proposto realizou a detecção de bactérias no plasma sanguíneo em torno de 30 minutos, com sensibilidade no intervalo entre 10 e 10⁵ UFC.mL⁻¹ para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

A urgência no controle de doenças infecciosas causadas por *S. aureus* e o desenvolvimento de testes rápidos, simples e econômicos para serem utilizados por países em subdesenvolvimento é destacado por [98] em sua pesquisa. Os testes realizados de análise de DNA e nanopartículas de ouro mostraram-se adequados na detecção do *S. aureus* em amostras de alimentos para diagnóstico no local com a captura das imagens por um *smartphone* e, em seguida, transferidas para um computador utilizando uma rede sem fio *Bluetooth* para análise e processamento quantitativo, chegando a um limite de detecção de 10^3 UFC.mL⁻¹.

Estudos recentes realizados por pesquisadoras do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) [99] demonstraram a eficiência e a sensibilidade no uso de biossensores eletroquímicos para o diagnóstico rápido do vírus Zika. Com o uso de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e anticorpos específicos ZIKV-NS1, os materiais foram depositados na placa de circuito impresso sensora desenvolvida pelo CTI e amostras de urina humana misturada com o antígeno do vírus Zika foram pipetados nos biossensores, que demonstraram a presença do vírus em alguns minutos. O sucesso desse teste rápido, que dispensa a necessidade de pessoas treinadas, faz com que o método possa ser distribuído e aplicado em áreas com infraestrutura de atendimento hospitalar deficiente ou com recursos limitados, para serem utilizados na triagem dos pacientes para acelerar o tratamento, ao contrário dos métodos atuais que utilizam amostras de sangue e que demoram de 4 a 6 dias após o aparecimento dos sintomas.

As técnicas existentes abordadas até então apresentam limitações e há uma grande necessidade de que sejam testadas em larga escala e em ambientes hospitalares durante a rotina diária médica e não apenas em laboratórios. Uma tabela comparativa foi elaborada pelo autor (Tabela 3.2) para uma melhor compreensão das características principais conforme as técnicas atualmente existentes e os tempos de detecção.

Tabela 3.2 - Comparação das técnicas de detecções de patógenos mais comuns e as características principais. Fonte: Própria (2021).

Técnicas aplicadas	Patógenos	Tempo de detecção	Características principais	Refs.
PCR-ELISA Tradicional	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Cronobacter</i> spp. Influenza Vírus	Horas ou dias	Custo operacional. Baixa sensibilidade. Necessita amplificação molecular. Necessita reagentes químicos. Técnica trabalhosa e demorada. Requer treinamento.	[102] [103] [104] [105] [106]
Espectroscopia por Fluorescência	<i>E. coli</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. carnosus</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i>	10 minutos à 6 horas	Custo dos equipamentos. Não requer reagentes químicos. Não invasivo. Possibilidade de diferenciar e caracterizar várias espécies. Sem o uso de marcadores. Técnica não aplicada em larga escala. Necessidade de laboratórios.	[32] [76] [81] [82] [83] [84] [100] [101]
Biossensores	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> H1N1 HPV Zika Vírus	5 a 30 minutos	Rápida detecção. Sem amplificação molecular. Operação simples e prática. Alta sensibilidade. Uso de amostras reais. Integração com dispositivos (<i>smartphones</i>). Não requer treinamentos.	[91] [92] [95] [96] [97] [99]

Avanços em tecnologias médico-biológicas levam cada vez mais a geração de dados não só de maior qualidade como em maiores volumes, tornando sua análise manual cada vez mais proibitiva. A biomedicina faz uso massivo de técnicas de imageamento, desde exames médicos como radiografia, ultrassonografia, ressonância magnética, tomografia, biópsias e tantas outras aplicações até escalas microscópicas, para detecção de vírus, bactérias, fungos, parasitas e corpos microscópicos, em geral.

Como apontado em [107-108], técnicas tradicionais de análise de dados vêm esbarrando em limites de processamento computacional ou mesmo em efetividade dos resultados em detrimento à grande massa de dados cada vez mais disponível e rico em detalhes. Junto a evolução da geração de dados, é possível observar uma tendência crescente do uso de técnicas em aprendizado de máquina com *deep learning* [109-111], que vem tomando espaço generalizado em tarefas complexas antes somente realizadas por profissionais de alta capacitação.

Com técnicas de *deep learning* é comum trabalhar com tarefas de detecção, classificação, quantificação e segmentação de imagens, possibilitando aplicações eficientes, mais rápidas e por vezes mais acuradas que a inspeção humana [108]. [112-114] demonstram como é possível monitorar patógenos de maneira efetiva através de *deep learning* e imageamento microscópico, auxiliando tanto no diagnóstico clínico como em pesquisas médicas.

As chamadas redes neurais convolucionais CNN (*Convolutional Neural Network*), introduzidas a primeira vez por [115], alavancaram substancialmente a efetividade das tarefas de *deep learning* voltadas para processamento de imagem. Com tais redes, foi possível ultrapassar os modelos computacionais existentes para detecção de diversos vírus [116-117], alguns alcançando melhores resultados que humanos especialistas [118]. Melhores métodos de contagem de cultura bacteriana são apresentados em [119-120].

Apesar da insurgência explosiva de dados na última década, muitas fontes ainda são fechadas ou privadas, fazendo desta uma necessidade maior por dados abertos na área de pesquisa. Iniciativas como esta são apresentadas em [121-123], como conjuntos de dados estruturados de microscopia e disponibilizados abertamente. Diante deste cenário, [107-109] demonstram como o *deep learning* parece estar consolidando técnicas cada vez mais efetivas para auxiliar na análise de dados médicos e biológicos.

Capítulo 4 - Metodologia

Neste capítulo é tratado o desenvolvimento do método do imunossensor eletroquímico para detecção rápida da presença da bactéria *S. aureus*. Esse método utiliza o material o óxido de zinco (ZnO) para o crescimento de nanobastões que dão suporte a imobilização do anticorpo na base sensora, mais especificamente ao eletrodo de trabalho.

Aborda ainda todo o processo de imobilização do anticorpo anti-*S. aureus* para observar a ligação do antígeno-anticorpo e sua interação química. O capítulo também discute a respeito da preparação das bactérias desde a obtenção até os procedimentos necessários para realizar as medições no aparelho potenciostato.

4.1 Materiais e reagentes

Devido à pandemia do COVID-19 a placa de circuito impresso PCB (*Printed Circuit Board*), contendo os eletrodos fabricados pelo Centro de Tecnologia Renato Archer (CTI) não puderam ser utilizados (Figura 4.1), devido às restrições de acesso aos laboratórios de pesquisa e a falta de trabalhadores, no período da realização dos experimentos e ensaios dos imunossensores.



Figura 4.1 - PCB produzida pelo CTI com os eletrodos. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).

Para contornar a situação foram adquiridos 75 eletrodos sensores (modelo C220AT; dropsens) da empresa Metrohm Instrumentação Analítica (Figura 4.2), para uso nos ensaios de

medições eletroquímicas. Esses sensores são constituídos de 3 eletrodos impressos integrados, sendo o eletrodo de trabalho e o auxiliar feitos de ouro (Au) e um eletrodo de referência em prata, com dimensões 3.4 x 1.0 x 0.05 cm. São fabricados para suportar altas temperaturas de até 800° C na sua base de cerâmica.

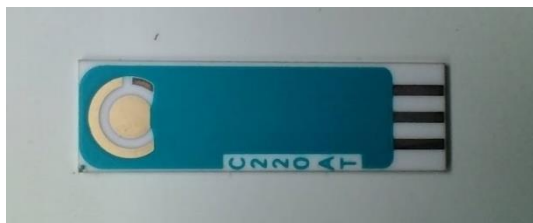


Figura 4.2 - Ddropsens modelo C220AT utilizado no trabalho. Fonte: Própria (2021).

O anticorpo utilizado a ser imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho foi o anti-*S. aureus* monoclonal [704] ab37644 adquirido da empresa *Abcam* (Cambridge, Reino Unido) e o material nitrato de zinco hexahidratado ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) adquirido da empresa *Sigma-Aldrich*.

A solução salina tamponada com fosfato PBS (*Phosphate buffer saline*) foi preparada combinando soluções de 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 10 mM de Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4 . A água peptonada utilizada é 0,1% (água destilada e peptona bacteriológica).

4.2 Preparação das amostras

A preparação das amostras bacteriológicas para a execução dos ensaios foram todas realizadas no Laboratório Multidisciplinar em Alimentos e Saúde (LabMAS) das Faculdades de Ciências Aplicadas da Unicamp (FCA). Como analito alvo de testes foram utilizados a bactéria *S. aureus* (ATCC25923) e como controle a bactéria *E. coli* (ATCC5922), adquiridos ambos da Fundação André Tosello (BR). O cultivo foi realizado em meio BHI (*Brain Heart Infusion*); Kasvi e incubado a 37 ° C por 24 h.

Após a diluição das amostras com água peptonada, o plaqueamento foi realizado em ágar *Baird Parker* e ágar padrão de contagem, respectivamente, e incubado a 37 ° C por 24-48 h. A concentração usada para o teste do imunossensor foi de $4,6 \times 10^8$ UFC para a cultura

de *S. aureus* (bactérias alvo de teste) e $6,7 \times 10^9$ UFC para *E. coli* (bactérias de controle). Essas concentrações foram obtidas do estoque original e diluídas para obter o valor das unidades formadora de colônias (UFC) utilizada nos ensaios dos imunossensores.

Foi necessário que o caldo passasse por um processo de inativação para a realização dos ensaios eletroquímicos para proporcionar uma segurança operacional. O procedimento para a inativação das bactérias seguiu com o aquecimento do caldo contendo *S. aureus* e *E. coli* a 95°C por 10 min. Em seguida, foi semeado em meio de cultura (ágar) e incubado a 37°C por 24-48 h para confirmação da inatividade.

Para verificar a ligação das amostras inativadas de *S. aureus* com o anticorpo anti-*S. aureus* [704] ab37644 foi realizado um teste utilizando o método ELISA indireto utilizando uma placa sólida de 96 poços (Figura 4.3), conforme protocolo descrito em [124]. As concentrações dos anticorpos anti-*S. aureus* [704] ab37644 utilizadas nesses testes foram de 1:1.000 e 1:10.000.

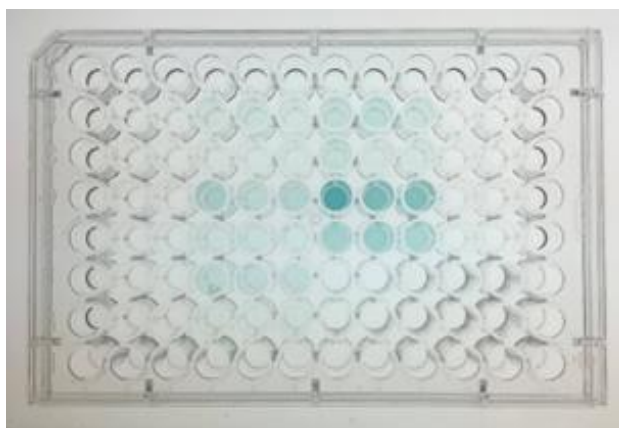


Figura 4.3 - Teste do anticorpo anti-*S. aureus* com a placa sólida de ELISA de 96 poços. Fonte: Própria (2021).

4.3 Crescimento de ZnO NRs e imobilização de anticorpos

Os procedimentos de preparo para o crescimento dos nanobastões de ZnO (NRs) foram realizados a partir da sintetização por deposição em banho químico usando 3,5% v/v NH_4OH em uma solução aquosa contendo 29,96 mM de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$.

Um recipiente de politetrafluoroetileno PTFE (*Polytetrafluoroethylene*) contendo a placa sensora dropsens e a solução aquosa foram agitadas e aquecidas a uma temperatura de 90° C durante 2h para que o crescimento de ZnO NRs fossem estimulados.

Em seguida, as amostras foram caracterizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Mira 3 TESCAN no laboratório de pesquisas do CTI para comprovar o crescimento dos nanobastões. A tensão aplicada na maior parte das análises foi de 10kV e as ampliações variaram de 10 k a 100 k vezes conforme as Figuras 4.4 e 4.5.

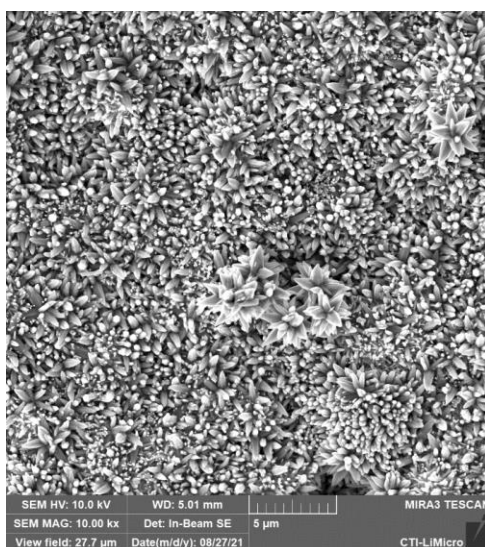


Figura 4.4 - Imagem obtida por MEV do crescimento dos nanobastões na base sensora. Imagem ampliada em 10 kx. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).

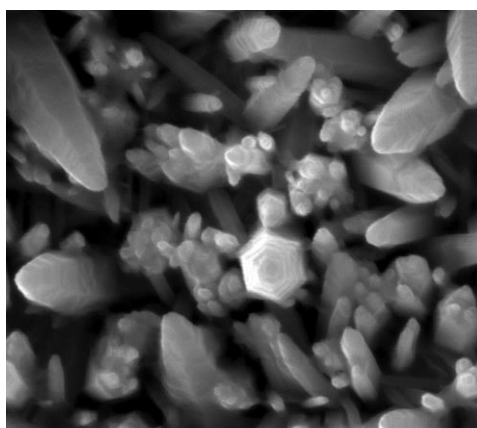


Figura 4.5 - Imagem obtida por MEV do crescimento dos nanobastões na base sensora. Imagem ampliada em 100 kx. Visualização do topo em hexagonal. Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).

Uma solução de 20 mM de cistamina e 2,5% de glutaraldeído foram usados para imobilizar o anticorpo na superfície dos nanobastões de ZnO. A concentração de anticorpo usada foi de 1:1000. Após a imobilização no eletrodo de trabalho, o imunossensor foi incubado por 12 h a 4° C em câmara úmida.

4.4 Caracterização do imunossensor

A base sensora de cerâmica (dropsens) e o imunossensor foram avaliados por voltametria cíclica (CV) e por voltametria por diferença de potencial (DPV). As amostras em triplicado foram analisadas para determinar a reprodutibilidade. A repetibilidade foi verificada através de 5 varreduras consecutivas em análises por CV. O tempo de incubação foi determinado após incubar o imunossensor com 10^5 UFC.mL⁻¹ de *S. aureus* por 15 e 30 min em temperatura ambiente. Para calcular a curva de calibração, os imunossensores foram lavados com PBS e então incubados com *S. aureus* em diferentes concentrações: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 UFC.mL⁻¹ em temperatura ambiente. Todos os experimentos foram realizados em câmara úmida. Os ensaios de seletividade e especificidade foram realizados nos imunossensores incubados com a bactéria *S. aureus* por 30 min em temperatura ambiente.

As seguintes etapas precederam a incubação durante o experimento para simular uma assepsia das mãos: algodão embebido em PBS, com pH 7,2 e espremido em um tubo de falcão. Em seguida, 945 µL da solução de assepsia das mãos foram misturados a 5 µL de solução não diluída de bactérias *S. aureus*.

O mesmo procedimento foi realizado para a bactéria *E. coli* para avaliar a especificidade do imunossensor. A avaliação foi realizada por análises CV e DPV.

4.5 Medições eletroquímicas

As medições eletroquímicas com CV e DPV foram registradas usando dois potenciostatos diferentes. Primeiro, um potenciostato Autolab de bancada PGSTAT302N da empresa Metrohm⁵ (Figura 4.6) foi usado para medir todas as amostras com bactérias inativadas no laboratório de pesquisas do CTI Renato Archer onde também os experimentos de

⁵ <https://www.metrohm.com/pt-br/>

crescimento dos nanobastões e posteriormente a fixação dos anticorpos foram realizados. O segundo potenciostato utilizado para o experimento com bactérias sem inativação e operado no laboratório LabMAS das Faculdades de Ciências Aplicadas (FCA) foi o modelo portátil PSTAT 910 (Figura 4.7) conectado via USB a um *notebook* com uma interface para receber o imunossensor. Esse modelo portátil foi cedido em forma de comodato para a demonstração do dispositivo e execução dos testes pela empresa Metrohm.



Figura 4.6 - Imagem do potenciostato Autolab de bancada PGSTAT302N. Fonte: Metrohm (2021).



Figura 4.7 - Imagem do potenciostato portátil modelo PSTAT 910 com interface para o sensor dropsens. Fonte: Própria (2021).

Durante os ensaios, o potencial aplicado variou de -0,6 a 0,6 V para análise de voltametria cíclica e a faixa de potencial de -0,1 a 0,6 V para análise de voltametria por pulso diferencial na taxa de varredura de 100 mVs^{-1} .

4.6 Análise estatística e limite de detecção

A análise de reprodutibilidade dos sensores dropsens foram calculadas utilizando o coeficiente de variação Cv onde: S é o desvio padrão e $\bar{X}$ é a média do pico de corrente anódica (Ipa) realizada em três diferentes sensores do ensaio, de acordo com a equação 4.1:

$$Cv = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

O coeficiente linear obtido pela incubação do imunossensor com seis concentrações diferentes de *S. aureus* foi calculado pela média das curvas de calibração de dois dias de testes consecutivos. O *software* utilizado para cálculos e ilustração gráfica foi o Microsoft Excel 2016.

O limite de detecção LOD (*limit of detection*) representa o mais baixo valor de concentração da substância que pode ser detectada com certo grau de confiança. De acordo com IPAC [42], o valor de LOD é dado pela equação 4.2:

$$LOD = \frac{\bar{X} + 3SD}{n^{\circ} \text{ amostras}} \quad (4.2)$$

onde: $\bar{X}$ é a média dos valores da corrente de pico anódica (Ipa) dos imunossensores, SD é o desvio padrão das várias medidas do branco das amostras e 3 é o fator numérico usado para a multiplicação do desvio padrão do branco.

Capítulo 5 - Testes e Resultados

Este capítulo os resultados das medições eletroquímicas com relação a seletividade, reprodutibilidade e tempos de incubação. São apresentados os testes de cultura e inativação das colônias de bactérias, necessárias para o avanço da pesquisa, e as imagens por microscopia eletrônica dos crescimentos dos nanobastões de zinco.

5.1 Cultura e inativação bacteriana

O primeiro passo para a execução e preparação dos testes foram submeter as colônias de bactérias *S. aureus* e *E. coli* a um processo de inativação térmica. A inativação da bactéria é essencial para preparar e caracterizar os imunossensores em um laboratório convencional. A Figura 5.1 mostra as fotos das placas com culturas de *E. coli* e *S. aureus* obtidas do caldo contendo bactérias não diluídas em seu estado de cultura original (Figura 5.1a, c) e em seguida o resultado do processo de inativação térmica (Figura 5.1b, d). Não foram observados crescimentos de colônias após a inativação térmica, indicando a eficiência da metodologia utilizada.

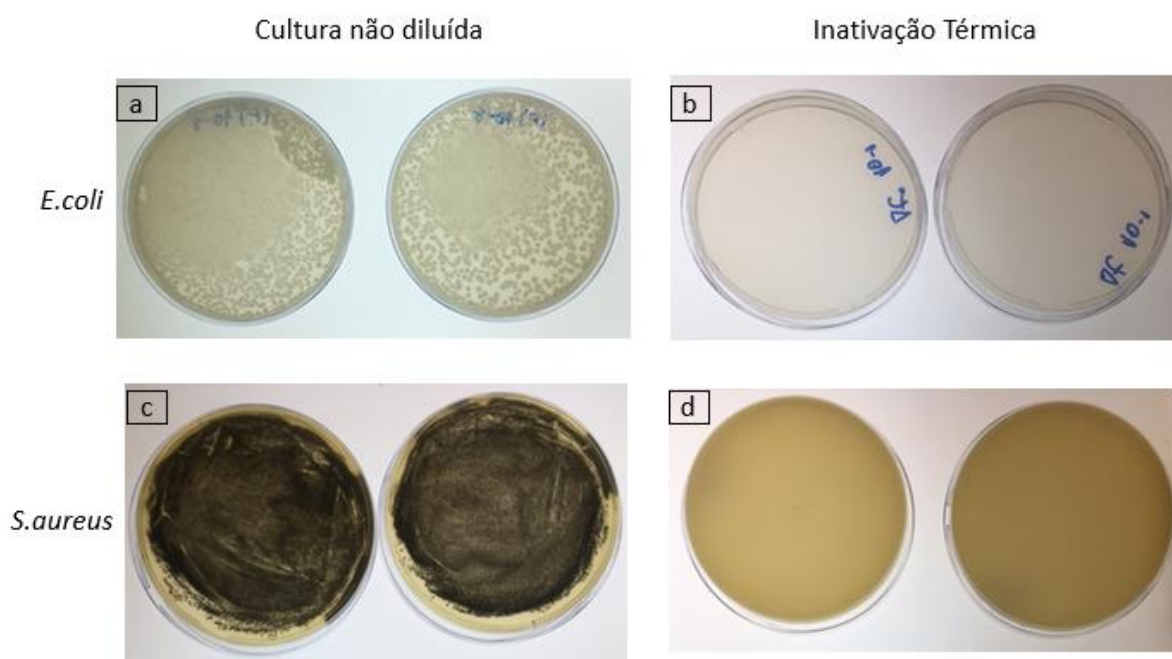


Figura 5.1 - Imagens das placas com as culturas de *E. coli* e *S. aureus* contendo: (a) e (c) cultura de bactérias não diluídas; (b) e (d) bactérias inativadas termicamente.

Fonte: Própria (2021).

A inativação das bactérias *S. aureus* e *E. coli* por calor apresentaram um melhor resultado após não serem visualizados crescimentos de colônias nas placas semeadas por esse método. Outro método que foi considerado, mas não apresentou um resultado eficiente foi a inativação através de uma solução de lauril sulfato de sódio (SLS), pois foi possível contabilizar o crescimento de $25,8 \times 10^3$ UFC nas amostras de *S. aureus* e uma quantidade incontável de colônias nas amostras de *E. coli*. (Figura 5.2b, d)

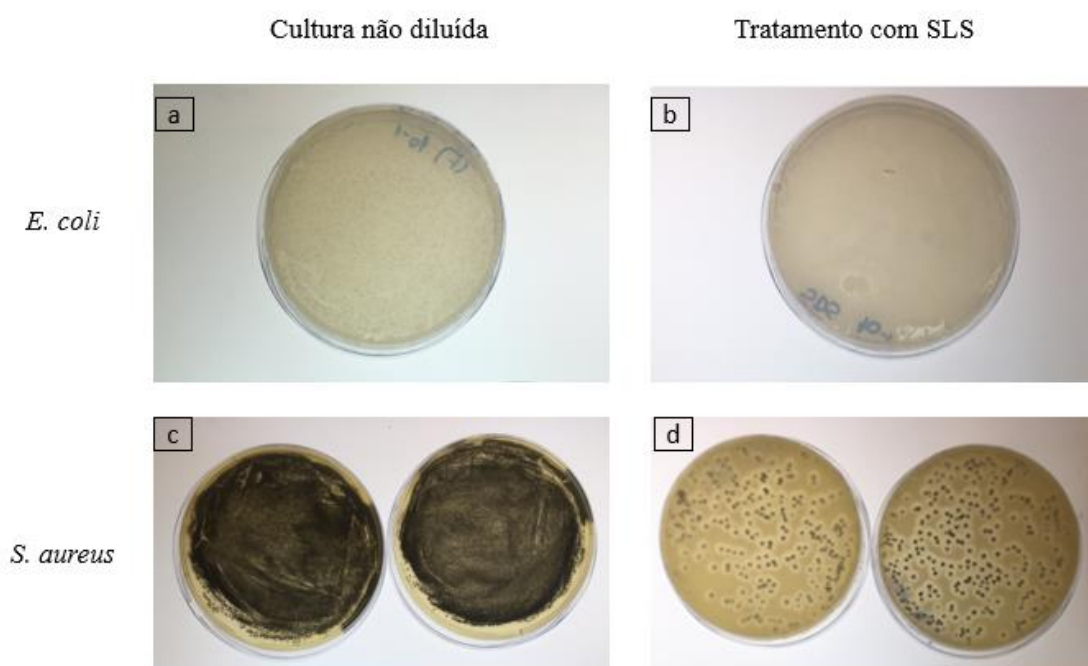


Figura 5.2 - Imagens das placas com as culturas de *E. coli* e *S. aureus* contendo: (a) e (c) cultura de bactérias não diluídas; (b) e (d) bactérias com tratamento SDS. Fonte: Própria (2021).

O teste utilizando o método ELISA indireto para as análises de absorvância demonstrou a capacidade de ligação específica com o anti-*S. aureus* para bactérias ativas e inativas preparadas nesta pesquisa. A Figura 5.3 mostra os resultados de absorvância obtidos para diferentes placas de ensaio: bactérias *S. aureus* e *E. coli* inativadas termicamente (não diluídas, diluídas 1:5 e 1:10) e bactérias no caldo original em diferentes concentrações de anticorpos (1:1.000 e 1:10.000).

O procedimento de inativação térmica não influenciou a especificidade da ligação do anti-*S. aureus*. Embora os valores de absorbância obtidos (0.29) para amostras inativadas por calor de *S. aureus* no melhor resultado com diluição 1:5 diferem do valor de absorbância das amostras com caldo original não diluída (0.26), os valores médios de absorbância se mostraram próximos. Devido a essa comparação obtida, um *S. aureus* termicamente inativado diluído a 1:5 e uma concentração de anticorpo 1:1.000 foram usados neste trabalho para preparar e testar todos os imunossensores por apresentarem um valor de absorbância mais próximo do que a concentração com 1:10000. Um dos parâmetros importantes durante o desenvolvimento de biossensores é o seu custo durante a preparação com o uso de pequenas quantidades de anticorpos. A resultado obtido com a concentração de 1:1000 anticorpos é um ótimo valor de diluição para que os custos de produção sejam viáveis comercialmente.

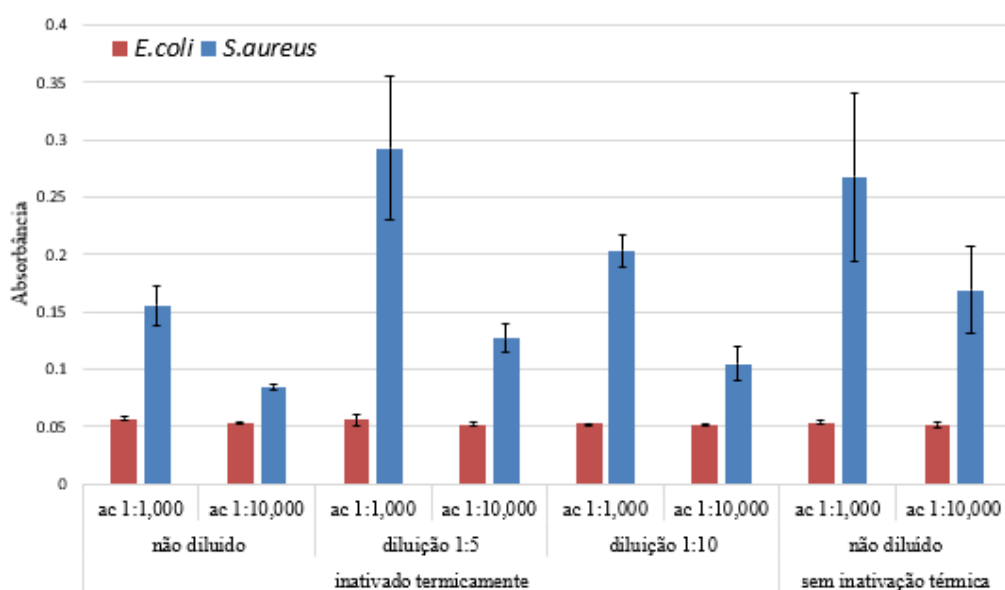


Figura 5.3 - Absorbância obtida pelo método ELISA indireto com amostras preparadas com diluições 1:5 e 1:10 de bactérias e diluições de anticorpos 1:1000 e 1:10000. Fonte: Própria (2021).

5.2 Crescimento de ZnO NRs e a imobilização do anti-*S. aureus*

A Figura 5.4a mostra o crescimento homogêneo de ZnO NRs na superfície em ouro do eletrodo de trabalho. Uma imagem MEV, tirada com maior ampliação (Figura 5.4b), revela que ZnO NRs tem uma base hexagonal com um diâmetro de 200 a 500 nm. Trabalhos publicados anteriormente demonstraram a importância do ZnO NRs na imobilização de biomarcadores [99] [125].

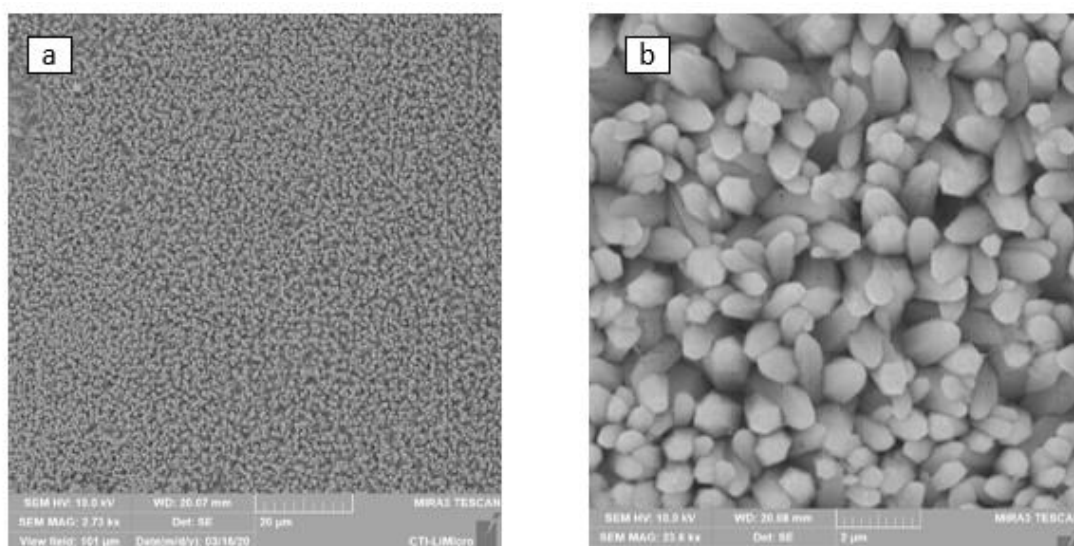


Figura 5.4 - Imagens obtidas por MEV dos nanobastões de ZnO cultivados no eletrodo de trabalho com ampliação de 2.73 kx (a) e 23.4 kx (b). Fonte: Imagem cedida pelo CTI (2021).

As análises CV confirmaram a imobilização do anti-*S. aureus* (Figura 5.5). Uma diminuição do pico de corrente anódica (I_{pa}) de 221 μA para 174 μA ocorre com a adição de ZnO NRs e anti-*S. aureus* em comparação com a base sensora devido às características de isolamento desses materiais. Como o I_{pa} e o I_{pc} vêm da oxidação e redução do ferrocianeto ($[Fe(CN)_6]^{4-} / [Fe(CN)_6]^{3-}$) [126], respectivamente, a adição de materiais isolantes proporcionou uma barreira para o transporte de ferrocianeto na superfície do eletrodo, prevalecendo a diminuição do sinal elétrico.

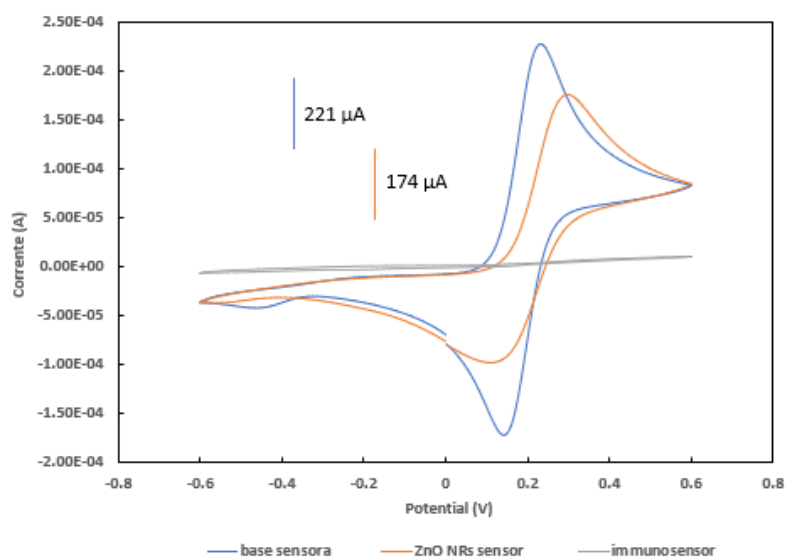


Figura 5.5 - Medições de CV da base sensora, base sensora com ZnO NRs e o imunossensor com uma taxa de varredura de 100 mVs^{-1} em $10 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_4 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ e $0,5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$.

5.3 Estabilidade e reprodutibilidade

Duas concentrações de ferrocianeto de potássio (10 mM e 2,5 mM) foram testadas, visando obter um melhor sinal elétrico. A Figura 5.6 mostra a diferença do valor do Ipa de $204 \mu\text{A}$ e $46 \mu\text{A}$ das duas concentrações. Para os testes de estabilidade e reprodutibilidade foram utilizados a concentração de 2,5 mM, pois a base sensora de ouro do eletrodo já auxilia como um facilitador de condutividade e ao usar a concentração 10 mM pode dificultar a visualização dos resultados nos gráficos obtidos pela medição de voltametria cíclica e por diferença de potencial.

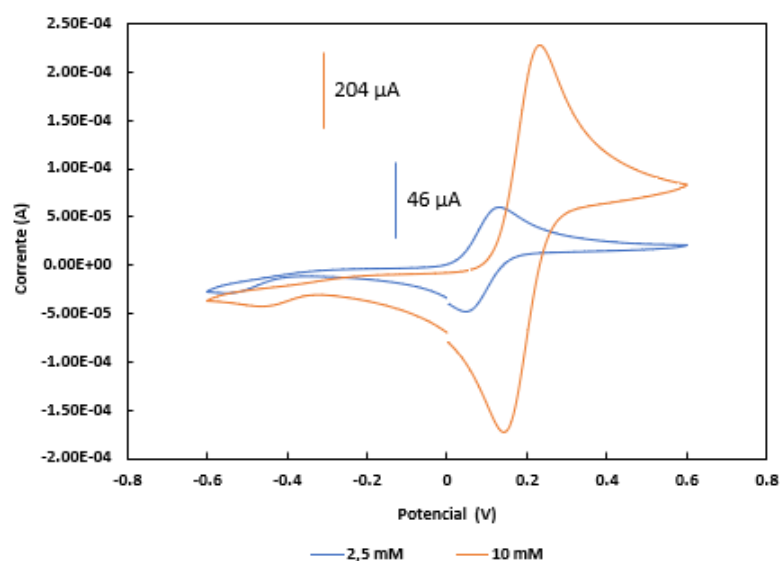


Figura 5.6 - Medições de CV comparando as duas concentrações de ferrocianeto de potássio de 10 mM e 2,5 mM.

Sucessivas medições com voltametria cíclica foram realizadas na presença de 2,5 mmol.L⁻¹ K₄ [Fe (CN)₆] e 0,5 mol.L⁻¹ NaNO₃ como mediador e a taxa de varredura em 100 mVs⁻¹ e potencial variando de -0,6V a 0,6V a descobrir a estabilidade e reprodutibilidade da base sensora e dos imunossensores. A base sensora mostra uma ligeira variação na corrente de pico anódica (60 μA) mesmo após 10 ciclos (Figura 5.7).

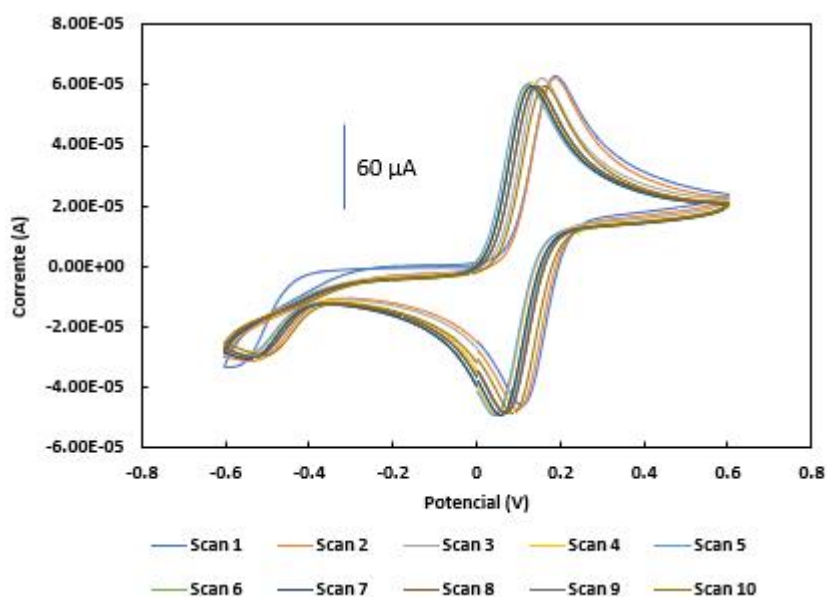


Figura 5.7 - Medições de CV em uma base sensora após 10 ciclos de varredura.

Em outras duas bases sensoras essas medições foram realizadas na presença de $10 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_4 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ e $0,5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ como mediador e a taxa de varredura em 100 mVs^{-1} e potencial variando de $-0,6\text{V}$ a $0,6\text{V}$ com 5 ciclos (Figura 5.8 e 5.9).

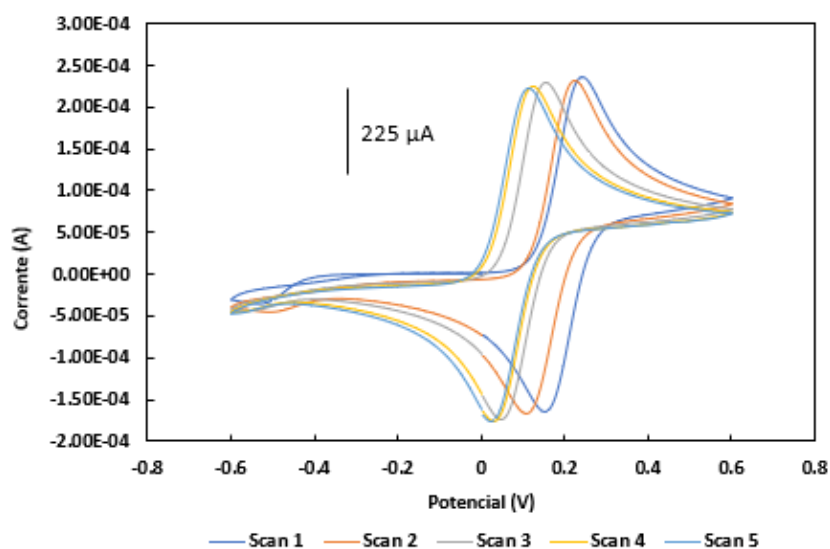


Figura 5.8 - Medições de CV em uma segunda base sensora após 5 ciclos de varredura.

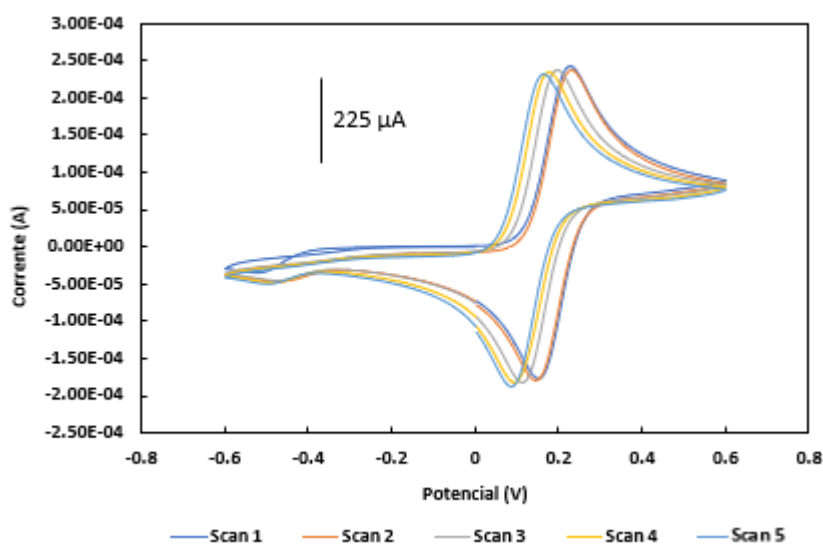


Figura 5.9 - Medições de CV em uma terceira base sensora após 5 ciclos de varredura.

Comparando 3 diferentes bases sensoras de fábrica (Figura 5.10), também podemos ver as variações da corrente de pico I_{pa} ($225 \mu\text{A}$). O moderado deslocamento do potencial de pico de uma base sensora para outra está relacionado ao eletrodo de referência à base de prata.

Apesar disso, o coeficiente de variação calculado com base no I_{pa} é de 6,45% indicando a excelente reprodutibilidade das bases sensores (dropsens).

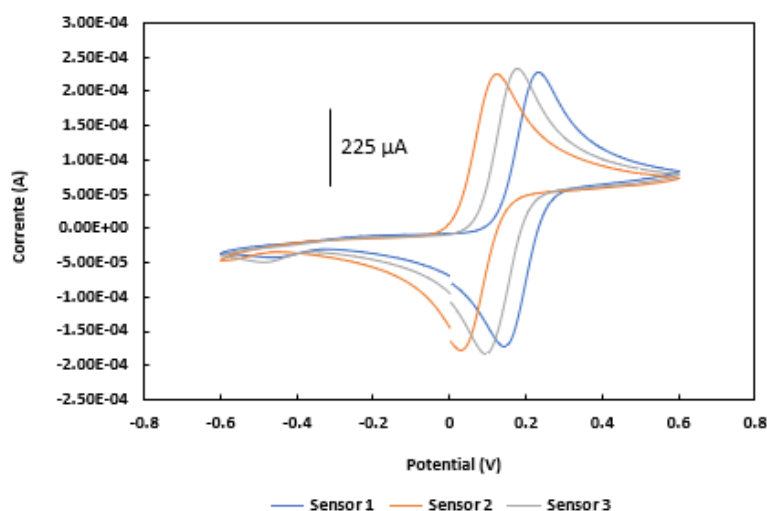


Figura 5.10 - Medições de CV em 3 bases sensoras diferentes para o cálculo do coeficiente de variação do I_{pa} .

Em relação à reprodutibilidade dos imunossensores, ou seja, a base sensora contendo ZnO NRs e anti-*S. aureus* imobilizado, análises em triplicata revelam pequena variação no potencial de pico I_{pa} de 6 μA (Figura 5.11) e I_p de 0.13 μA (Figura 5.12). No entanto, o coeficiente de variação foi de 15% para três imunossensores de *S. aureus*. As curvas DPV mostraram apenas um pico de oxidação, atribuído à oxidação do ferrocianeto ($[Fe(CN)_6]^{4-} / [Fe(CN)_6]^{3-}$). Como mencionado, o discreto deslocamento do potencial de pico de um imunossensor para outro está relacionado ao eletrodo de referência à base de prata.

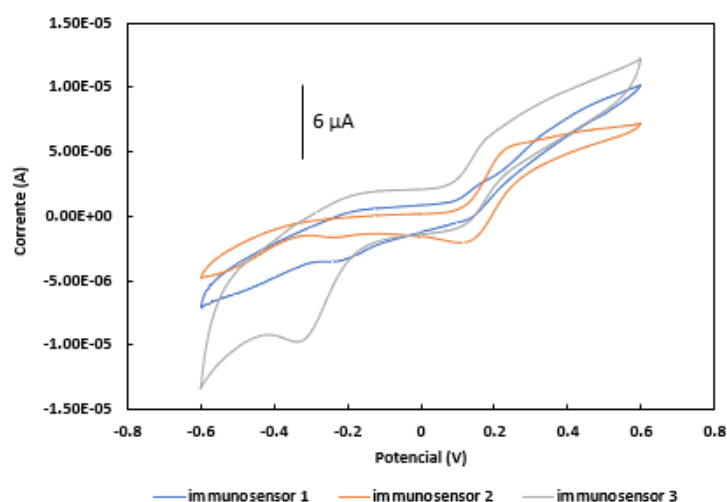


Figura 5.11 - Medição de CV de 3 imunossensores e a variação do pico I_{pa} (6 μA).

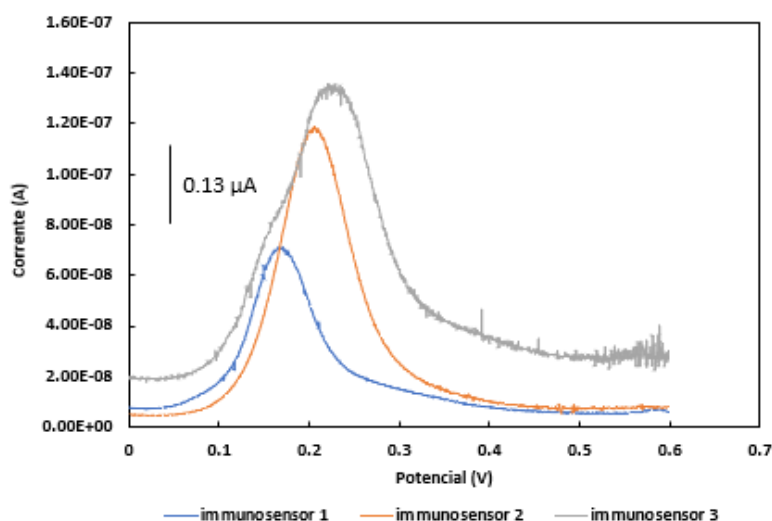


Figura 5.12 - Medição por DPV de 3 imunossensores e a variação da corrente de pico I_p ($0.13 \mu A$).

5.4 Tempo de incubação e curva de calibração

Todas as medições para análises do tempo de incubação durante a curva de calibração foram realizadas usando $10 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $0,5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$. O tempo de incubação, necessário para que haja a interação entre o antígeno alvo (bactéria) e o anticorpo, é um parâmetro essencial no desenvolvimento de dispositivos para a realização junto ao paciente (POC) e é necessário para aplicações no dia a dia dos profissionais de saúde para que o controle de IRAS seja eficiente. Devido a isso, 2 tempos de incubações diferentes (15 e 30 min) foram testados usando um antígeno *S. aureus* 10^8 UFC.mL^{-1} (Figuras 5.13 e 5.14).

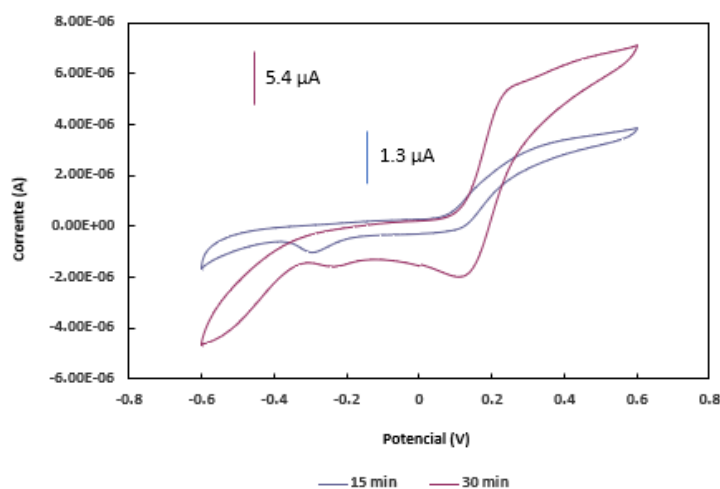


Figura 5.13 - Medições de CV de 2 tempos de incubações diferentes no imunossensores e o valor da corrente de pico anódica I_{pa} de 15min ($5.4 \mu A$) e 30min ($1.3 \mu A$).

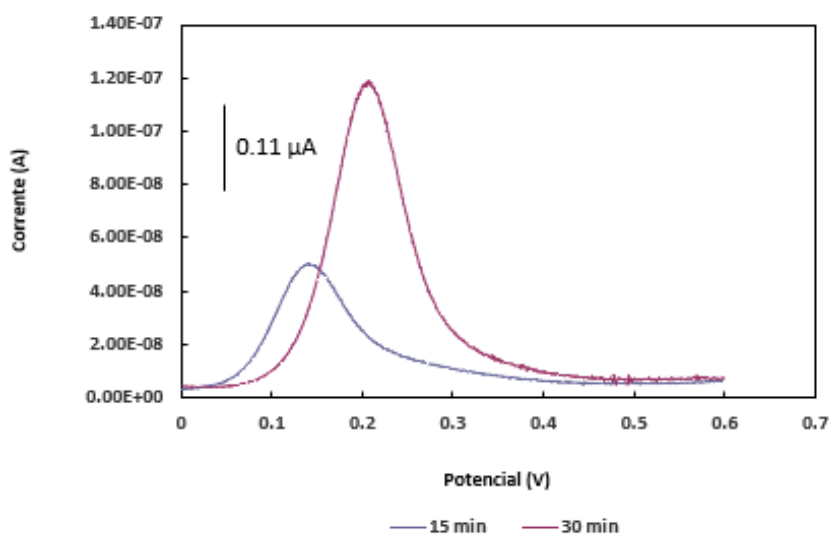


Figura 5.14 - Medições de DPV dos tempos 15min e 30min de incubações diferentes no imunossensores e o valor da corrente de pico I_p ($0.11 \mu A$).

Após 15 minutos de incubação, surge um valor de I_{pa} nítido ($1.3 \mu A$). No entanto, o pico fica mais evidente aumentando o tempo para 30 min ($5.4 \mu A$). A visualização maior do I_{pa} registrado em um maior tempo de incubação está relacionada ao tempo necessário para a bactéria interagir com o anticorpo.

Os tempos de incubações apresentados nesse trabalho são menores que os tempos necessários para a realização do método de detecção por PCR e ELISA [127]. Foi possível elaborar a partir desse resultado uma tabela de comparação (Tabela 5.1) com alguns outros vários métodos de detecções eletroquímicos e categorias de biossensores em destaques publicados na literatura no intervalo dos anos de 2007 a 2021 em detalhes. Nota-se também que a pesquisa elaborada nessa tese apresenta um dos menores tempos de detecção de bactérias utilizando nanobastões de ZnO como material imobilizador dos anticorpos na base sensora.

Tabela 5.1 - Comparação entre os vários métodos de detecções e os tipos de biossensores mais relevantes encontrados na literatura em detalhes. Fonte: Própria (2021).

Biomarcador	Tipo de eletrodos	Analito	Tempo detecção (min)	LOD	Variação Linear	Ref.
Anti-rabbit IgG (RbIgG)	MPA-SAM onto gold electrodes	protein A-bearing <i>S. aureus</i> cells	30	1.0×10^6 cells mL ⁻¹	4.8×10^5 - 4.8×10^8 cells mL ⁻¹	[128]
Mouse anti- <i>S.aureus</i>	Gold Nanoparticle and magnetic nanoparticle	milk	40	1.5×10^3 CFU.mL ⁻¹	1.5×10^2 - 1.5×10^6 CFU.mL ⁻¹	[129]
Thiolated ssDNA and <i>S.aureus</i> aptamer	(rGO) and gold nanoparticles (AuNPs)	fish and water	60	10 CFU.mL ⁻¹	$10 - 10^6$ CFU.mL ⁻¹	[130]
Immuno sensor	SAM monolayer	sea water	NA	10 CFU.mL ⁻¹	$10 - 10^7$ CFU.mL ⁻¹	[131]
Biosensor	Magnetic nanobeads-peptide	food matrices	NA	40 CFU.mL ⁻¹	$7.5 - 7.5 \times 10^6$ CFU.mL ⁻¹	[92]
MecA DNA	Tetrahedral nanostructures onto a gold electrode	MRSA gDNA	240	10 fM synthetic DNA	10 fM – 31.6 pM	[132]
<i>S.aureus</i> 16S rRNA	H ₂ -modified Au NPs associated with silver wire	human serum and milk	100	50 CFU.mL ⁻¹	$50 - 10^7$ CFU.mL ⁻¹	[133]
Anti <i>S.aureus</i>	Gold nanorods on glassy carbon electrodes	milk	50	2.4×10^2 CFU.mL ⁻¹	1.8×10^3 - 1.8×10^7 CFU.mL ⁻¹	[134]
Anti-MRSA Ab	Carbon electrodes modified with Au NPs	NA	30	13 CFU.mL ⁻¹	$10 - 10^6$ CFU.mL ⁻¹	[135]
Triple-helix DNA aptamer	Gold electrode	lake water, tap water and honey	180	8 CFU.mL ⁻¹	$30 - 3 \times 10^8$ CFU.mL ⁻¹	[136]
DNA walker and DNA nano flowers	Gold electrode	lake water, tap water, and honey	180	9 CFU.mL ⁻¹	$60 - 6 \times 10^7$ CFU.mL ⁻¹	[137]
Antibody IgG	Modified Au disk	NA	NA	NA	10^{-21} M - 10^{-16} M	[138]
Immuno sensor	ZnO NRs onto gold electrodes	<i>S.aureus</i>	30	$2,6 \times 10^3$ CFU.mL ⁻¹	$10^4 - 10^8$ CFU.mL ⁻¹	Este trabalho

A curva de calibração foi realizada com diferentes concentrações de *S. aureus* variando de 10^4 - 10^8 UFC.mL⁻¹. Conforme as concentrações da bactéria *S. aureus* aumentam, os valores de Ipa também aumentam de 5 μ A até 153 μ A (Figura 5.15). Além das características isolantes das bactérias, Wang, Z. *et al.*, [139] observaram um aumento dos sinais eletroquímicos devido aos metabólitos secretados por *S. aureus*. Esses metabólitos auxiliam eficientemente a transferência de elétrons durante o processo eletroquímico. Ao contrário do observado com a adição de ZnO NRs e do anticorpo, o aumento do Ipa com maior concentração de *S. aureus* deve estar relacionado à presença desses metabólitos na suspensão preparada para esse experimento, potencializando o transporte de elétrons.

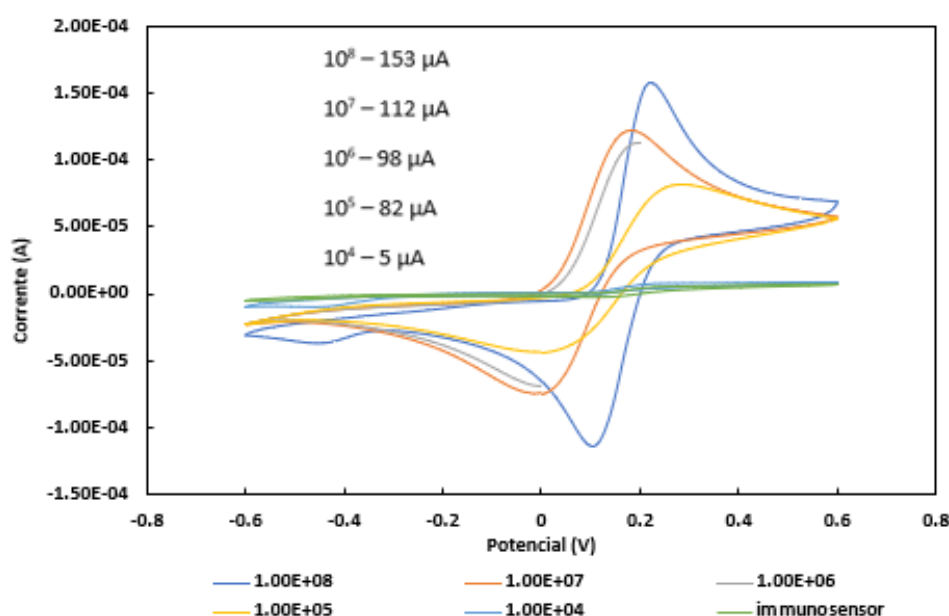


Figura 5.15 - Medições em CV para obtenção da curva de calibração com diferentes concentrações de *S. aureus* variando de 10^4 - 10^8 UFC.mL⁻¹

O imunossensor foi capaz de detectar *S. aureus* na faixa de 10^4 - 10^8 UFC.mL⁻¹ com um coeficiente de linearidade de 0.9603 (Figura 5.16). O limite de detecção calculado é $2,6 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Este valor é inferior ao encontrado nas mãos após a lavagem (10^4 - 10^6 UFC.mL⁻¹) [140] [8]. Assim, o imunossensor desenvolvido pode ser uma alternativa em potencial para o controle de IRAS.

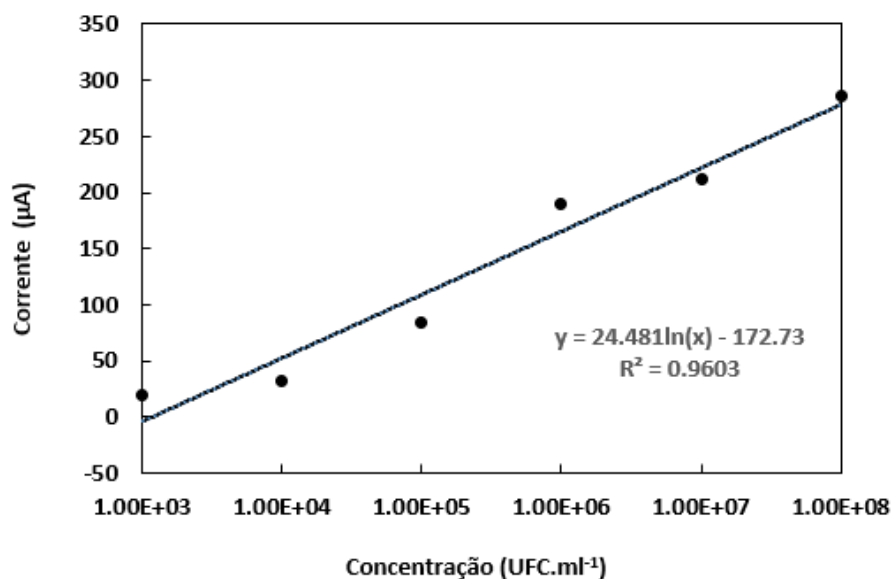


Figura 5.16 - Coeficiente de linearidade representando o pico de corrente anódica em relação a concentração de bactérias *S. aureus* na faixa de 10^4 - 10^8 UFC.mL⁻¹

Além do menor tempo de incubação, outra vantagem do imunossensor desenvolvido aqui é a ausência de nanopartículas de ouro ou outros materiais que encarecem o processo de produção e consequentemente o seu custo final.

5.5 Seletividade e especificidade

As Figuras 5.17 (medições em CV) e 5.18 (medições em DPV) mostram os resultados obtidos após a incubação *E. coli* ou *S. aureus* adicionado em uma solução de assepsia das mãos aplicado em um imunossensor com sua medição eletroquímica realizado em no potenciostato de bancada. Nenhuma variação de pico de corrente é observada para *E. coli*, indicando que essas bactérias não se ligam ao anticorpo. Este resultado confirma a excelente especificidade do imunossensor. Análises anteriores de absorvância para bactérias não inativadas e inativadas também confirmaram a especificidade do anticorpo usado (Figura 5.3). O imunossensor também é seletivo, visto que os componentes presentes na solução de assepsia das mãos não interferiram nos ensaios. Um maior valor de I_{pa} (69 µA) obtido para a solução

de assepsia de mão de *S. aureus* no imunossensor poderia ser justificado devido à presença de metabólitos secretados por *S. aureus*, conforme observado por Wang, Z. *et al.* [139].

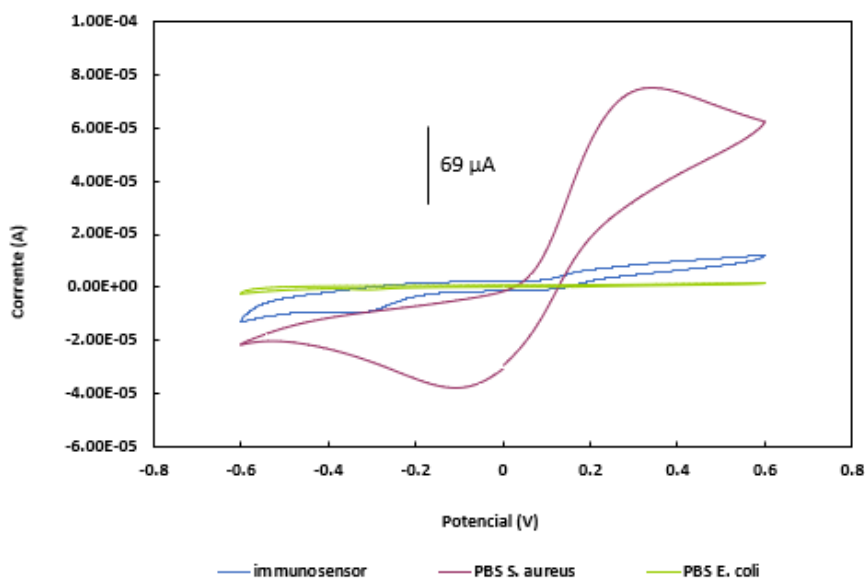


Figura 5.17 - Medições de CV no imunossensor com *S. aureus* e *E. coli*. com taxa de varredura em 100 mVs^{-1} e potencial variando de -0,6V a 0,6V.

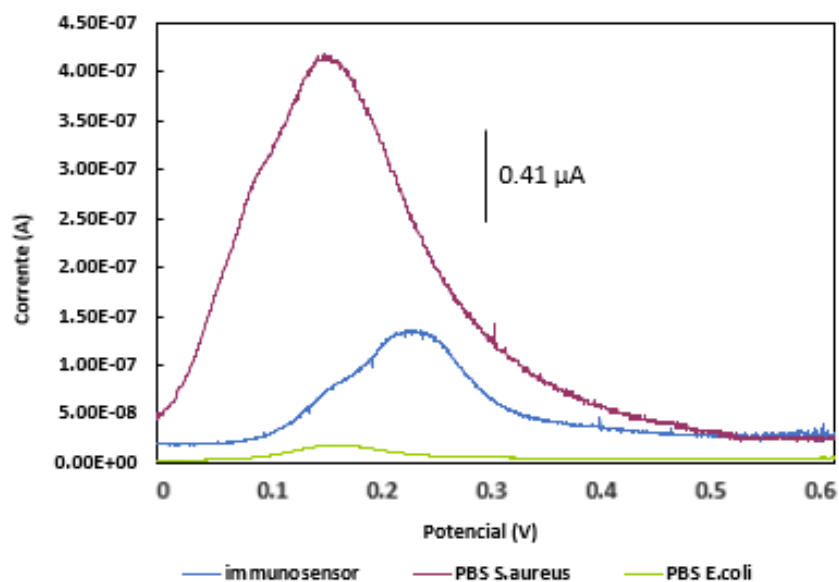


Figura 5.18 - Medições de DPV no imunossensor com *S. aureus* e *E. coli* com taxa de varredura em 100 mVs^{-1} e potencial variando de -0,1V a 0,6V.

Um novo ensaio utilizando um caldo de *S. aureus* e *E. coli* sem diluição da concentração do caldo original e sem o procedimento de inativação foi realizado no laboratório LabMAS das Faculdades de Ciências Aplicadas (FCA) em conjunto com o potenciostato portátil. Os resultados demonstraram uma excelente resposta do imunossensor ao analisar as curvas de voltametria cíclica (Figura 5.19).

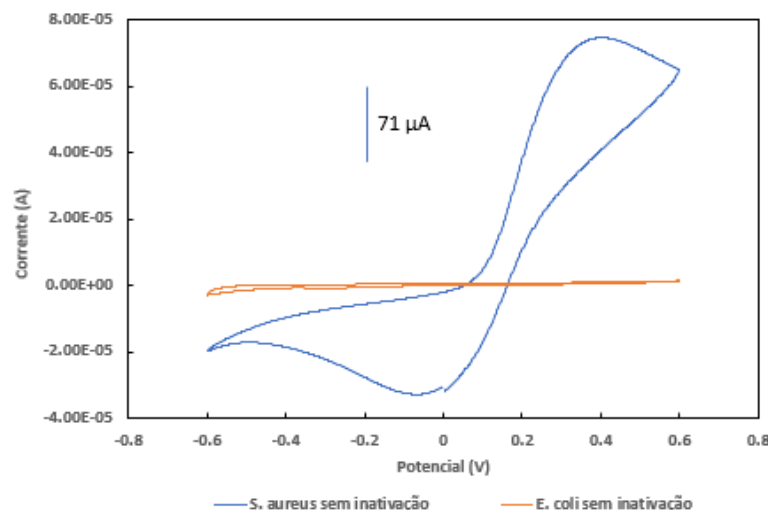


Figura 5.19 - Medições de CV no imunossensor com *S. aureus* e *E. coli* sem o processo de inativação e sua concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ (não diluído).

Com os resultados apresentados pode-se notar as vantagens do imunossensor baseado em ZnO NRs dentre elas: menor tempo de incubação, a possibilidade de ser usado em ensaios de bancada ou como dispositivos de testes próximos ao paciente, limite de detecção mais baixo do que a faixa de concentração de *S. aureus* presente nas mãos após a lavagem. Não necessitam de uma variedade de reagentes e altas concentrações de amostras e o seu resultado rápido auxilia na decisão de um tratamento adequado. Além disso, o experimento demonstrou pela primeira vez a possibilidade de detectar a presença de *S. aureus* em uma simulação com assepsia das mãos para o controle de IRAS.

A incorporação da nanotecnologia aos imunossensores permite uma análise molecular rápida e com alta sensibilidade de dimensões reduzidas o que facilita o desenvolvimento de dispositivos cada vez mais portátil. A corrida tecnológica na busca por nanopartículas que ofereçam a melhor condutividade elétrica, de fácil preparação, aquece o mercado de testes rápidos para sejam produzidos sensores eficazes e viáveis comercialmente.

Os estudos de imunossensores tem sido aplicado na maioria para diagnósticos virais, porém são utilizados também para detecção precoce de Alzheimer, câncer, e no combate a contaminação biológica de alimentos, do solo e da água conforme podemos perceber durante os estudos deste trabalho, apresentados na Tabela 5.1.

A técnica de espectrografia por fluorescência também demonstrou durante os estudos realizados que proporcionou a criação da Tabela 3.2, ser uma técnica excelente para detecção de microrganismos, porém o custo dos equipamentos e a necessidade de operação em laboratórios impede seu uso em locais próximos ao paciente (POC) e além do ambiente hospitalar

A versatilidade dos *smartphones* disponíveis no mercado transformando-os em um espectrômetro para a detecção de marcadores fluorescentes presentes no DNA, nanopartículas e em bactérias e vírus é vista como uma solução viável, promissora e de detecção rápida, de forma com que haja a ruptura e a dependência da utilização de microscópios de grande porte e inviabilize o seu uso em locais próximos ao paciente.

A combinação de técnicas de espectrografia por fluorescência com a dos imunossensores é vista pela comunidade científica como algo possível e viável como demonstra os estudos recentes de [141] onde a detecção rápida do norovírus foi realizada com sucesso utilizando os *smartphone* como unidade de processamento e visualização dos resultados. Porém, ainda há a necessidade de testes clínicos utilizando o *smartphones* para validar a flexibilidade e confiabilidade do aparelho levando assim a técnica de espectrografia mais próxima ao paciente.

Em tempos de pandemia como a do COVID-19, o desenvolvimento e pesquisas com o uso de imunossensores que forneçam testes com resultados rápidos e sejam aplicados a toda população, podem ainda facilitar o planejamento das ações estratégicas de identificação do indivíduo contaminado e na adequação da carga no sistema de saúde contribuindo para que medidas primitivas restritivas, como a de isolamento social, sejam adotadas.

Capítulo 6 – Conclusões

Os testes com os imunossensores eletroquímicos baseado em ZnO NRs demonstraram ser promissores para detectar bactérias *S. aureus* e possíveis de serem implantados em larga escala para garantirem as diretrizes quanto ao monitoramento dos procedimentos de assepsia das mãos. O imunossensor apresentou excelente resposta e boa reprodutibilidade e especificidade, sendo uma alternativa viável para o controle e redução de infecções hospitalares. Conseguiu detectar com sucesso o *S. aureus* na faixa de 10^4 - 10^8 UFC.mL⁻¹. O limite de detecção calculado é $2,6 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

O imunossensor apresentou uma excelente resposta também na presença de *S. aureus* sem inativação, apto para detecção em ambientes reais. Alcançou com sucesso a detecção de *S. aureus* em um tempo menor do que os modelos tradicionais de contagem de cultura bacteriana, provando ser uma ferramenta poderosa para ser utilizada em centros cirúrgicos, UTI e unidades básicas de saúde.

Avanços na área da nanotecnologia e da eletrônica na busca de cada vez mais dispositivos portáteis que possa servir para uma detecção rápida de patógenos em ambientes domiciliares, facilitando o diagnóstico de doenças, atrairá não só pesquisadores da área química e biológica, mas também proporcionará um envolvimento com o setor industrial para o oferecimento de um produto comercialmente confiável e atraente para o mercado biomédico.

6.1 Sugestões para trabalhos futuros

A área de imunossensores eletroquímicos deve crescer ainda mais principalmente na pesquisa de novos nanomateriais para que novas formas de imobilização de anticorpos nos eletrodos sejam desenvolvidas para cada vez mais conseguir uma maior estabilidade e condutividade das reações de óxido-redução.

Embora a base sensora em cerâmica tenha apresentado resultados satisfatórios há um aumento significativo de dispositivos sensores analíticos baseados em papel celulose fluidica com células eletroquímicas. Além de apresentar a característica de porosidade, o papel pode ser manipulado facilmente, é dobrável, leve e de descarte simples e seguro.

A pesquisa aqui apresentada permite ainda contribuir para estudos futuros em relação à combinação de técnicas de imunoensaio de fluorescência, agregando um elemento fluoróforo à ligação antígeno-anticorpo, para destacar o surgimento de aglutinações para que a imagem resultante possa ser analisada computacionalmente é promissora. A análise do brilho mínimo, formato e tamanho através de redes neurais, para que aprendam a diferenciar essas características para o desenvolvimento de métodos de detecções mais rápidos de microrganismos, é uma proposta de pesquisa futura, no sentido que o produto possa ser comercializado em forma de *kits*, a serem disponibilizados para o mercado.

Referências

1. Centers for Disease Control and Prevention. Acute care hospital surveillance for central line-associated bloodstream infections. Disponível em <http://www.cdc.gov/nhsn/acute-care-hospital/clabsi/index.html>, Acesso em 25/10/2021.
2. New Jersey Department of Health on healthcare-associated infections. The Department is required to review and analyze this data and report the results in New Jersey's annual Hospital Performance Report. Disponível em <https://www.nj.gov/health/healthcarequality/health-care-professionals/hospital-performance-report/index.shtml>, Acesso em 25/10/2021.
3. Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions. World Health Organization 2020. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334216/9789240010789-eng.pdf>, Acesso em 25/10/2021.
4. Patient safety. Global action on patient safety. World Health Organization 2018. Disponível em https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB144/B144_29-en.pdf, Acesso em 25/10/2021.
5. Global progress report on wash in health care facilities. World Health Organization 2020. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/9789240017542>, Acesso em 25/10/2021.
6. Pittet D. Improving adherence to hand hygiene practice: a multidisciplinary approach. *Emerg Infect Dis.* (2001) Mar-Apr;7(2):234-40. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010217>
7. R. Freeman, S. James, Patients ' Hand Washing, *Critical Care Nurse* Vol 37, No. 3, JUNE (2017). <https://doi.org/10.4037/ccn2017694>
8. G. Kampf, H. Löffler, P. Gastmeier, Hand Hygiene for the Prevention of Nosocomial Infections. *Deutsches Aerzteblatt Online.* 106 (2009) 649–655. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0649>
9. C. Sohrabi, Z. Alsafi, N. O'Neill, M. Khan, A. Kerwan, A. Al-Jabir, C. Iosifidis, R. Agha, World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19), *Int. J. Surg.* 76 (2020) 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.02.034>
10. S.G.S. Shah, A. Farrow, A commentary on “World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel Coronavirus (COVID-19),” *Int. J. Surg.* 76 (2020) 128–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.03.001>
11. R. Samson, G.R. Navale, M.S. Dharne, Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19, *3 Biotech.* 10 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02369-0>
12. EU, An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU / EEA Wider testing is crucial for COVID-19 control What COVID-19 rapid tests are available in the EU Are all CE-marked COVID-19 rapid tests ready to use in routine diagnostics, 2020. Disponível

em <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Overview-rapid-test-situation-for-COVID-19-diagnosis-EU-EEA.pdf>, Acesso 25/10/2021.

13. Adhikari SP, Meng S, Wu YJ, Mao YP, Ye RX, Wang QZ, Sun C, Sylvia S, Rozelle S, Raat H, Zhou H. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infect Dis Poverty*. 2020 Mar 17;9(1):29. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00646-x>
14. F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.M. Chen, W. Wang, Z.G. Song, Y. Hu, Z.W. Tao, J.H. Tian, Y.Y. Pei, M.L. Yuan, Y.L. Zhang, F.H. Dai, Y. Liu, Q.M. Wang, J.J. Zheng, L. Xu, E.C. Holmes, Y.Z. Zhang, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature*. 579 (2020) 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
15. J.T. Wu, K. Leung, M. Bushman, N. Kishore, R. Niehus, P.M. de Salazar, B.J. Cowling, M. Lipsitch, G.M. Leung, Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China, *Nat. Med.* 26 (2020) 506–510. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7>
16. United Nations Children’s Fund (UNICEF), World Health Organization (WHO), Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017: Special focus on inequalities, Launch Version July 12 Main Rep. Prog. Drink. Water , Sanit. Hyg. (2019).
17. J. Liu, Z. Geng, Z. Fan, J. Liu, H. Chen, Point-of-care testing based on smartphone: The current state-of-the-art (2017–2018), *Biosens. Bioelectron.* 132 (2019) 17–37. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.068>
18. C. Wang, M. Liu, Z. Wang, S. Li, Y. Deng, N. He, Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices, *Nano Today*. 37 (2021) 101092. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101092>
19. S. Kumar, M. Nehra, S. Khurana, N. Dilbaghi, V. Kumar, A. Kaushik, K.H. Kim, Aspects of point-of-care diagnostics for personalized health wellness, *Int. J. Nanomedicine*. 16 (2021) 383–402. <https://doi.org/10.2147/IJN.S267212>
20. T. Alawsi, Z. Al-Bawi, A review of smartphone point-of-care adapter design, *Eng. Reports*. 1 (2019) 1–30. <https://doi.org/10.1002/eng2.12039>.
21. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56–58 (1991). <https://doi.org/10.1038/354056a0>
22. Ozin, G. A., & Arsenault, A. (2015). *Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials*. Royal Society of Chemistry.
23. L. Syedmoradi, M. Daneshpour, M. Alvandipour, F.A. Gomez, H. Hajghassem, K. Omidfar, Point of care testing: The impact of nanotechnology, *Biosens. Bioelectron.* 87 (2017) 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.084>
24. S.K. Arya, S. Saha, J.E. Ramirez-Vick, V. Gupta, S. Bhansali, S.P. Singh, Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: Review, *Anal. Chim. Acta*. 737 (2012) 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.048>

25. Y. He, W. Li, Z. Wang, H. Chen, L. Tian, D. Liu, Nosocomial infection among patients with COVID-19: A retrospective data analysis of 918 cases from a single center in Wuhan, China, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 41 (2020) 982–983. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.126>.
26. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med.* 1998 Aug 20;339(8):520-32. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
27. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR. Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus Working Group. *N Engl J Med.* 1999 Feb 18;340(7):493-501. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902183400701>
28. Pittet D, Allegranzi B, Boyce J; World Health Organization World Alliance for Patient Safety First Global Patient Safety Challenge Core Group of Experts. The World Health Organization Guidelines on Hand Hygiene in Health Care and their consensus recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009 Jul;30(7):611-22. <https://doi.org/10.1086/600379>
29. J. Marsden, Keeping patients safe: A practical guide, *Community Eye Heal. J.* 28 (2015) 23–25.
30. J.S. Reilly, L. Price, S. Lang, C. Robertson, F. Cheater, K. Skinner, A. Chow, A Pragmatic Randomized Controlled Trial of 6-Step vs 3-Step Hand Hygiene Technique in Acute Hospital Care in the United Kingdom, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 37 (2016) 661–666. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.51>
31. ThermoFisher Scientific, Chapter 1 - Fluorophores and Their Amine-Reactive Fluorescent Derivatives, *Mol. Probes ® Handbook-A Guid. to Fluoresc. Probes Labeling Technol.* (2010) 13–95.
32. K. Vishwanath, N. Ramanujam, Fluorescence Spectroscopy In Vivo, in: *Encycl. Anal. Chem.*, 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0102.pub2>
33. R. Custodio, L.T. Kubota, J.C. de Andrade, Lei dos processos de absorção da radiação, *Rev. Chemkeys.* (2018) 1–5. <https://doi.org/10.20396/chemkeys.v0i3.9615>
34. M. Singer, O. College, J. Hutchinson, J. Mahr, R. Bear, D. Rintoul, S. Telleen, *UCD Bis2A Intro to Biology v1.2*, (2015) 527.
35. A.D.G. Rodrigues, J.C. Galzerani, Espectroscopia de IV, UV e Raman, *Rev. Bras. Ensino Física.* 34 (2012) 4309.
36. A.B.T. Ghisaidoobe, S.J. Chung, Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on förster resonance energy transfer techniques, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 22518–22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
37. A. Shahzad, G. Köhler, M. Knapp, E. Gaubitzer, M. Puchinger, M. Edetsberger, Emerging applications of fluorescence spectroscopy in medical microbiology field, *J. Transl. Med.* 7 (2009) 1–6. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-99>

38. H.E. Giana, L. Silveira, R.A. Zângaro, M.T.T. Pacheco, Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis, *J. Fluoresc.* 13 (2003) 489–493. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000008059.74052.3c>
39. Clark, L.C. and Lyons, C. (1962) Electrode Systems for Continuous Monitoring Cardiovascular Surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29–45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
40. D. Thevenot, K. Toth, R. Durst, G. Wilson, D. Thevenot, K. Toth, R. Durst, G. Wilson, *Electrochemical biosensors : Recommended definitions and classification (Technical Report)* (2014).
41. M. Pohanka, P. Skládal, *Electrochemical biosensors - Principles and applications*, *J. Appl. Biomed.* 6 (2008) 57–64. <https://doi.org/10.32725/jab.2008.008>
42. J. Mocak, A.M. Bond, S. Mitchell, G. Scollary, A.M. Bond, A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques, *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 297–328. <https://doi.org/10.1351/pac199769020297>
43. V. Gau, S.C. Ma, H. Wang, J. Tsukuda, J. Kibler, D.A. Haake, Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification, *Methods.* 37 (2005) 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.008>
44. J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, *Curr. Issues Mol. Biol.* 10 (2008) 1–12. <https://doi.org/10.21775/cimb.010.001>
45. R.C. Alkire, D.M. Kolb, J. Lipkowski, P.N. Ross, Chemically Modified Electrodes, *Chem. Modif. Electrodes.* 11 (2011) 1–267. <https://doi.org/10.1002/9783527627059>
46. I.R.W.Z. de Oliveira, I.C. Vieira, Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana, *Quim. Nova.* 29 (2006) 932–939. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000500009>
47. E.B. Bahadir, M.K. Sezgintürk, Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses, *Anal. Biochem.* 478 (2015) 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011>
48. F. Mollarasouli, S. Kurbanoglu, S.A. Ozkan, The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis, *Biosensors.* 9 (2019) 1–19. <https://doi.org/10.3390/bios9030086>
49. J.P. Metters, R.O. Kadara, C.E. Banks, New directions in screen printed electroanalytical sensors: An overview of recent developments, *Analyst.* 136 (2011) 1067–1076. <https://doi.org/10.1039/c0an00894j>
50. L.M. Aleixo, Voltametria: conceitos e técnicas, *Rev. Chemkeys.* (2018) 1–21. <https://doi.org/10.20396/chemkeys.v0i3.9609>
51. V. Uskoković, Nanotechnologies: What we do not know, *Technol. Soc.* 29 (2007) 43–61. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2006.10.005>

52. C.A. Haberkettl, Nanomedicine: Destination or journey?, *Nanotechnology*. 13 (2002). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/13/4/201>
53. N.C. Tansil, Z. Gao, Nanoparticles in biomolecular detection, *Nano Today*. 1 (2006) 28–37. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70020-2](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70020-2)
54. M.C. Daniel, D. Astruc, Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293–346. <https://doi.org/10.1021/cr030698+>
55. B. Zhong, X. Huang, G. Wen, H. Yu, X. Zhang, T. Zhang, H. Bai, Large-Scale Fabrication of Boron Nitride Nanotubes via a Facile Chemical Vapor Reaction Route and Their Cathodoluminescence Properties, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9794-8>
56. A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N.H.M. Kaus, L.C. Ann, S.K.M. Bakhori, H. Hasan, D. Mohamad, Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism, *Nano-Micro Lett.* 7 (2015) 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
57. Z. Yuan, J. Yu, N. Wang, Y. Jiang, Well-aligned ZnO nanorod arrays from diameter-controlled growth and their application in inverted polymer solar cell, *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 22 (2011) 1730–1735. <https://doi.org/10.1007/s10854-011-0353-6>
58. S. Zhu, X. Chen, F. Zuo, M. Jiang, Z. Zhou, D. Hui, Controllable synthesis of ZnO nanograss with different morphologies and enhanced performance in dye-sensitized solar cells, *J. Solid State Chem.* 197 (2013) 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2012.09.001>
59. M. Pudukudy, A. Hetieqa, Z. Yaakob, Synthesis, characterization and photocatalytic activity of annealingdependent quasi spherical and capsule like ZnO nanostructures, *Appl. Surf. Sci.* 319 (2014) 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.07.050>
60. V. Gau, S.C. Ma, H. Wang, J. Tsukuda, J. Kibler, D.A. Haake, Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification, *Methods*. 37 (2005) 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.008>
61. A.L. Silva, E.M. Pinto, E.A. Ponzio, E.C. de Figueiredo, F.S. Semaan, Bioinspired Chemically Modified Electrodes for Electroanalysis, *New Dev. Anal. Chem. Res.* (2015) 41–86.
62. Y.C. Li, E.L. Melenbrink, G.J. Cordonier, C. Boggs, A. Khan, M.K. Isaac, L.K. Nkhonjera, D. Bahati, S.J. Billinge, S.M. Haile, R.A. Kreuter, R.M. Crable, T.E. Mallouk, An Easily Fabricated Low-Cost Potentiostat Coupled with User-Friendly Software for Introducing Students to Electrochemical Reactions and Electroanalytical Techniques, *J. Chem. Educ.* 95 (2018) 1658–1661. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.800340>
63. M. McAdow, H.K. Kim, A.C. DeDent, A.P.A. Hendrickx, O. Schneewind, D.M. Missiakas, Preventing staphylococcus aureus sepsis through the inhibition of its agglutination in blood, *PLoS Pathog.* 7 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002307>

64. M. Torrent, D. Pulido, M.V. Nogués, E. Boix, Exploring New Biological Functions of Amyloids: Bacteria Cell Agglutination Mediated by Host Protein Aggregation, *PLoS Pathog.* 8 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003005>
65. E. Romero-Ben, J.J. Cid, M. Assali, E. Fernández-García, R.E. Wellinger, N. Khiar, Surface modulation of single-walled carbon nanotubes for selective bacterial cell agglutination, *Int. J. Nanomedicine.* 14 (2019) 3245–3263. <https://doi.org/10.2147/IJN.S179202>
66. D.F. Llorca, I. Parra, M.Á. Sotelo, G. Lacey, A vision-based system for automatic hand washing quality assessment, *Mach. Vis. Appl.* 22 (2011) 219–234. <https://doi.org/10.1007/s00138-009-0234-7>
67. M.A.S. Mondol, J.A. Stankovic, Harmony: A Hand Wash Monitoring and Reminder System using Smart Watches, in: *Proc. 12th EAI Int. Conf. Mob. Ubiquitous Syst. Comput. Netw. Serv.*, 2015. <https://doi.org/10.4108/eai.22-7-2015.2260042>
68. M. Baslyman, R. Rezaee, D. Amyot, A. Mouttham, R. Chreyh, G. Geiger, A. Stewart, S. Sader, Real-time and location-based hand hygiene monitoring and notification: Proof-of-concept system and experimentation, *Pers. Ubiquitous Comput.* 19 (2015) 667–688. <https://doi.org/10.1007/s00779-015-0855-y>
69. A.F. Widmer, Replace Hand Washing with Use of a Waterless Alcohol Hand Rub?, *Clin. Infect. Dis.* 31 (2000) 136–143. <https://doi.org/10.1086/313888>
70. W. Zingg, T. Haidegger, D. Pittet, Hand coverage by alcohol-based handrub varies: Volume and hand size matter, *Am. J. Infect. Control.* 44 (2016) 1689–1691. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.07.006>
71. Lehotsky, L. Szilágyi, T. Ferenci, L. Kovács, R. Pethes, G. Wéber, T. Haidegger, Quantitative impact of direct, personal feedback on hand hygiene technique, *J. Hosp. Infect.* 91 (2015) 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.05.010>
72. G. Katara, N. Hemvani, S. Chitnis, V. Chitnis, D. Chitnis, Surface disinfection by exposure to germicidal UV light, *Indian J. Med. Microbiol.* 26 (2008) 241–242. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.42034>
73. D.L. Narayanan, R.N. Saladi, J.L. Fox, Ultraviolet radiation and skin cancer, *Int. J. Dermatol.* 49 (2010) 978–986. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x>
74. L. Szilágyi, Á. Lehotsky, M. Nagy, T. Haidegger, B. Benyó, Z. Benyó, Stery-hand: A new device to support hand disinfection, in: *2010 Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. EMBC'10*, 2010: pp. 4756–4759. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2010.5626377>
75. Á. Lehotsky, L. Szilágyi, A. Demeter-IclĂnzán, T. Haidegger, G. Wéber, Education of hand rubbing technique to prospective medical staff, employing UV-based digital imaging technology, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 63 (2016) 217–228. <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.2.6>

76. H.E. Giana, L. Silveira, R.A. Zângaro, M.T.T. Pacheco, Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis, *J. Fluoresc.* 13 (2003) 489–493. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000008059.74052.3c>
77. M. Škodová, F. García Urra, A. Gimeno Benítez, M.R. Jiménez Romano, A. Gimeno Ortiz, Hand hygiene assessment in the workplace using a UV lamp, *Am. J. Infect. Control.* 43 (2015) 1360–1362. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.07.003>
78. L.P. Petersson, U.V. Albrecht, L. Sedlacek, S. Gemein, J. Gebel, R.P. Vonberg, Portable UV light as an alternative for decontamination, *Am. J. Infect. C* (2014).
79. J.M. Boyce, N.L. Havill, B.A. Moore, Terminal Decontamination of Patient Rooms Using an Automated Mobile UV Light Unit, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 32 (2011) 737–742. <https://doi.org/10.1086/661222>
80. W.J. Kowalski, 2020 COVID-19 Coronavirus Ultraviolet Susceptibility 2020 COVID-19 Coronavirus Ultraviolet Susceptibility, (2020). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22803.22566>
81. M.S. Ammor, Recent advances in the use of intrinsic fluorescence for bacterial identification and characterization, *J. Fluoresc.* 17 (2007) 455–459. <https://doi.org/10.1007/s10895-007-0180-6>
82. A. Shahzad, G. Köhler, M. Knapp, E. Gaubitzer, M. Puchinger, M. Edetsberger, Emerging applications of fluorescence spectroscopy in medical microbiology field, *J. Transl. Med.* 7 (2009) 1–6. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-99>
83. Bhattacharjee, Metabolic fingerprinting of bacteria by fluorescence lifetime imaging microscopy, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04032-w>
84. L.R. Dartnell, T.A. Roberts, G. Moore, J.M. Ward, J.P. Muller, Fluorescence Characterization of Clinically-Important Bacteria, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075270>
85. S. Kanchi, M.I. Sabela, P.S. Mdluli, Inamuddin, K. Bisetty, Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.021>
86. E. Widiatmoko, Widayani, M. Budiman, M. Abdullah, Khairurrijal, A simple spectrophotometer using common materials and a digital camera, *Phys. Educ.* 46 (2011) 332–339. <https://doi.org/10.1088/0031-9120/46/3/014>
87. A.J.S. McGonigle, T.C. Wilkes, T.D. Pering, J.R. Willmott, J.M. Cook, F.M. Mims, A. V. Parisi, Smartphone spectrometers, *Sensors (Switzerland).* 18 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.3390/s18010223>
88. L.J. Wang, Y.C. Chang, R. Sun, L. Li, A multichannel smartphone optical biosensor for high-throughput point-of-care diagnostics, *Biosens. Bioelectron.* 87 (2017) 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.021>

89. X. Zheng, Y. Wang, S. Bu, Z. Chen, J. Wan, Point-of-care detection of 16S rRNA of *Staphylococcus aureus* based on multiple biotin-labeled DNA probes, *Mol. Cell. Probes*. 47 (2019) 101427. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101427>
90. P. Henrique, Q. Miranda, M. Escovedo, J.A. Chaker, Biosensores para Diagnóstico de Doenças Causadas por Vírus: Uma Revisão, Hegemonia – Rev. Eletrônica Do Programa Mestr. Em Direitos Humanos, Cid. e Violência/Ciência Política Do Cent. Univ. Unieuro. 27 (2019) 105–127.
91. R. Kizek, L. Krejcova, P. Michalek, M. Merlos Rodrigo, Z. Heger, S. Krizkova, M. Vaculovicova, D. Hynek, V. Adam, Nanoscale virus biosensors: state of the art, *Nanobiosensors Dis. Diagnosis*. (2015) 47. <https://doi.org/10.2147/ndd.s56771>
92. G.A.R.Y. Suaifan, S. Alhogail, M. Zourob, Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*, *Biosens. Bioelectron*. 90 (2017) 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.047>
93. A. Roda, E. Michelini, M. Zangheri, M. Di Fusco, D. Calabria, P. Simoni, Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives, *TrAC - Trends Anal. Chem*. 79 (2016) 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.019>
94. D. Zhang, Q. Liu, Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection, *Biosens. Bioelectron*. 75 (2016) 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.037>
95. D. Xu, X. Huang, J. Guo, X. Ma, Automatic smartphone-based microfluidic biosensor system at the point of care, *Biosens. Bioelectron*. 110 (2018) 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.018>
96. M. Mathelié-Guinlet, T. Cohen-Bouhacina, I. Gammoudi, A. Martin, L. Béven, M.H. Delville, C. Grauby-Heywang, Silica nanoparticles-assisted electrochemic
97. C.W. Lee, H.Y. Chang, J.K. Wu, F.G. Tseng, Ultra-sensitive electrochemical detection of bacteremia enabled by redox-active gold nanoparticles (raGNPs) in a nano-sieving microfluidic system (NS-MFS), *Biosens. Bioelectron*. 133 (2019) 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.040>
98. X. Zheng, Y. Wang, S. Bu, Z. Chen, J. Wan, Point-of-care detection of 16S rRNA of *Staphylococcus aureus* based on multiple biotin-labeled DNA probes, *Mol. Cell. Probes*. 47 (2019) 101427. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101427>
99. A.M. Faria, T. Mazon, Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor, *Talanta*. 203 (2019) 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.080>
100. T. Belal, K. Romdhane, B. Jean-Louis, B. Tahar, D. Eric, L. Franoise, Optical fiber-based synchronous fluorescence spectroscopy for bacterial discrimination directly from colonies on agar plates, *Anal. Methods*. 3 (2011) 133–143. <https://doi.org/10.1039/c0ay00135j>
101. M.E. Gosnell, A.G. Anwer, S.B. Mahbub, S. Menon Perinchery, D.W. Inglis, P.P. Adhikary, J.A. Jazayeri, M.A. Cahill, S. Saad, C.A. Pollock, M.L. Sutton-Mcdowall, J.G.

- Thompson, E.M. Goldys, Quantitative non-invasive cell characterisation and discrimination based on multispectral autofluorescence features, *Sci. Rep.* 6 (2016) 23453. <https://doi.org/10.1038/srep23453>
102. J. Hu, R. Huang, Y. Wang, X. Wei, Z. Wang, Y. Geng, J. Jing, H. Gao, X. Sun, C. Dong, C. Jiang, Development of duplex PCR-ELISA for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 in food, *J. Microbiol. Methods.* 154 (2018) 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.10.017>
103. S. Kahya, H.S. Guran, O. Yilmaz, PCR and ELISA for staphylococcal enterotoxins and detection of some exotoxins from *Staphylococcus* spp. strains by PCR, *Med. Weter.* 72 (2016) 28–33.
104. Y. Li, L. Cao, C. Zhang, Q. Chen, F. Lu, X. Bie, Z. Lu, Development and evaluation of a PCR-ELISA assay for the detection and quantification of *Cronobacter* spp., *Int. Dairy J.* 33 (2013) 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.009>
105. P. Daly, T. Collier, S. Doyle, PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk, *Lett. Appl. Microbiol.* 34 (2002) 222–226. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01074.x>
106. M. Munch, L.P. Nielsen, K.J. Handberg, P.H. Jørgensen, Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA, *Arch. Virol.* 146 (2001) 87–97. <https://doi.org/10.1007/s007050170193>.
107. Y. Zhang, H. Jiang, T. Ye, and M. Juhas, “Deep Learning for Imaging and Detection of Microorganisms,” *Trends in Microbiology*, vol. 29, no. 7, pp. 569–572, Jul. 2021, <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.01.006>
108. G. Litjens et al., “A survey on deep learning in medical image analysis,” *Medical Image Analysis*, vol. 42, pp. 60–88, Dec. 2017, <https://doi.org/10.1016/J.MEDIA.2017.07.005>
109. A. B. Levine, C. Schlosser, J. Grewal, R. Coope, S. J. M. Jones, and S. Yip, “Rise of the Machines: Advances in Deep Learning for Cancer Diagnosis,” *Trends in Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 157–169, Mar. 2019, <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2019.02.002>
110. M. S. Draz et al., “Virus detection using nanoparticles and deep neural network-enabled smartphone system,” *Science Advances*, vol. 6, no. 51, pp. 5354–5370, Dec. 2020, <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABD5354>
111. J. Riordon, D. Sovilj, S. Sanner, D. Sinton, and E. W. K. Young, “Deep Learning with Microfluidics for Biotechnology,” *Trends in Biotechnology*, vol. 37, no. 3, pp. 310–324, Mar. 2019, <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2018.08.005>
112. C. S. Goldsmith and S. E. Miller, “Modern uses of electron microscopy for detection of viruses,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 4, pp. 552–563, Oct. 2009, <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-09>
113. D. K. Das, r. Mukherjee, and c. Chakraborty, “Computational microscopic imaging for malaria parasite detection: a systematic review,” *Journal of Microscopy*, vol. 260, no. 1, pp. 1–19, Oct. 2015, <https://doi.org/10.1111/JMI.12270>

114. K. P. Smith, A. D. Kang, and J. E. Kirby, “Automated interpretation of blood culture gram stains by use of a deep convolutional neural network,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 56, no. 3, Mar. 2018, <https://doi.org/10.1128/JCM.01521-17>
115. Y. Lecun, P. Haffner, and Y. Bengio, “Object Recognition with Gradient-Based Learning,” Aug. 2000.
116. K. S. Devan, P. Walther, J. von Einem, T. Ropinski, H. A. Kestler, and C. Read, “Detection of herpesvirus capsids in transmission electron microscopy images using transfer learning,” *Histochemistry and Cell Biology* 2018 151:2, vol. 151, no. 2, pp. 101–114, Nov. 2018, <https://doi.org/doi: 10.1007/S00418-018-1759-5>.
117. E. Ito, T. Sato, D. Sano, E. Utagawa, and T. Kato, “Virus Particle Detection by Convolutional Neural Network in Transmission Electron Microscopy Images,” *Food and Environmental Virology* 2018 10:2, vol. 10, no. 2, pp. 201–208, Jan. 2018, <https://doi.org/10.1007/S12560-018-9335-7>
118. C. Xiao et al., “Virus identification in electron microscopy images by residual mixed attention network,” Elsevier, Accessed: Oct. 21, 2021. [Online]. Disponível em https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169260720315996?casa_token=q7X_1Tj2d5MAAAAA:FKrxJbjTD1cldh0IldMdHkKIAk6W09qPy8lMEqcPHtDKtyTn-uaVIKCjNX32vKWnzZs7osp9uw, Acesso em 25/10/2021.
119. H. Wang et al., “Early detection and classification of live bacteria using time-lapse coherent imaging and deep learning,” *Light: Science & Applications* 2020 9:1, vol. 9, no. 1, pp. 1–17, Jul. 2020, <https://doi.org/10.1038/s41377-020-00358-9>
120. A. Ferrari, S. Lombardi, and A. Signoroni, “Bacterial colony counting with Convolutional Neural Networks in Digital Microbiology Imaging,” *Pattern Recognition*, vol. 61, pp. 629–640, Jan. 2017, <https://doi.org/10.1016/J.PATCOG.2016.07.016>
121. G. Kylberg, m. Uppström, k.-o. Hedlund, g. Borgefors, and i.-m. Sintorn, “Segmentation of virus particle candidates in transmission electron microscopy images,” *Journal of Microscopy*, vol. 245, no. 2, pp. 140–147, Feb. 2012, <https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.2011.03556.X>
122. A. A. N. D. M. K. A. N. D. S. P. A. N. D. B.-W. M. A. N. D. O. D. Zieliński Bartosz AND Plichta, “Deep learning approach to bacterial colony classification,” *PLOS ONE*, vol. 12, no. 9, pp. 1–14, Oct. 2017, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184554>
123. E. A. Hay and R. Parthasarathy, “Performance of convolutional neural networks for identification of bacteria in 3D microscopy datasets,” *PLOS Computational Biology*, vol. 14, no. 12, p. e1006628, Dec. 2018, <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1006628>
124. F.M. Simabuco, C. Carromeu, L.E. Farinha-Arcieri, R.E. Tamura, A.M. Ventura, Production of polyclonal antibodies against the human respiratory syncytial virus nucleoprotein and phosphoprotein expressed in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 53 (2007) 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.12.016>

125. A.M. Faria, E.B.M.I. Peixoto, C.B. Adamo, A. Flacker, E. Longo, T. Mazon, Controlling parameters and characteristics of electrochemical biosensors for enhanced detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43680-y>
126. V. V. Tkach, A. Santos, R. Ojani, P.I. Yagodynets, Estudo matemático de estabilidade do desempenho do sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como mediador na eletrorredução de nitrito, com fins eletroanalíticos, *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 45 (2016) 77–91. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n1.58017>
127. X. Zhao, C. Wei, J. Zhong, S. Jin, Research advance in rapid detection of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Biotechnol. Equip.* 30 (2016) 827–833. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1209433>
128. V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, Development of an amperometric immunosensor for the quantification of *Staphylococcus aureus* using self-assembled monolayer-modified electrodes as immobilization platforms, *Electroanalysis*. 19 (2007) 1476–1482. <https://doi.org/10.1002/elan.200703893>
129. Y.J. Sung, H.J. Suk, H.Y. Sung, T. Li, H. Poo, M.G. Kim, Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* in milk, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.12.052>
130. F. Jia, N. Duan, S. Wu, X. Ma, Y. Xia, Z. Wang, X. Wei, Impedimetric aptasensor for *Staphylococcus aureus* based on nanocomposite prepared from reduced graphene oxide and gold nanoparticles, *Microchim. Acta*. 181 (2014) 967–974. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1195-8>
131. K. Bekir, H. Barhoumi, M. Braiek, A. Chrouda, N. Zine, N. Abid, A. Maaref, A. Bakhrouf, H. Ben Ouada, N. Jaffrezic-Renault, H. Ben Mansour, Electrochemical impedance immunosensor for rapid detection of stressed pathogenic *Staphylococcus aureus* bacteria, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 15796–15803. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4761-7>
132. L. Xu, W. Liang, Y. Wen, L. Wang, X. Yang, S. Ren, N. Jia, X. Zuo, G. Liu, An ultrasensitive electrochemical biosensor for the detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Biosens. Bioelectron.* 99 (2018) 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.014>
133. Y. Feng, D. Zhou, L. Gao, F. He, Electrochemical biosensor for rapid detection of bacteria based on facile synthesis of silver wire across electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 168 (2020) 112527. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112527>
134. E. Han, X. Li, Y. Zhang, M. Zhang, J. Cai, X. Zhang, Electrochemical immunosensor based on self-assembled gold nanorods for label-free and sensitive determination of *Staphylococcus aureus*, *Anal. Biochem.* 611 (2020) 113982. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113982>

135. V.Q. Khue, T.Q. Huy, V.N. Phan, A. Tuan-Le, D.T. Thanh Le, M. Tonezzer, N.T. Hong Hanh, Electrochemical stability of screen-printed electrodes modified with Au nanoparticles for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Mater. Chem. Phys.* 255 (2020) 123562. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123562>
136. R. Cai, Z. Zhang, H. Chen, Y. Tian, N. Zhou, A versatile signal-on electrochemical biosensor for *Staphylococcus aureus* based on triple-helix molecular switch, *Sensors Actuators, B Chem.* 326 (2021) 128842. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128842>
137. R. Cai, S. Zhang, L. Chen, M. Li, Y. Zhang, N. Zhou, Self-Assembled DNA Nanoflowers Triggered by a DNA Walker for Highly Sensitive Electrochemical Detection of *Staphylococcus aureus*, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 13 (2021) 4905–4914. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c22062>
138. K.P. Divya, V. Dharuman, Electrochemical label free sensing of human IgG – Protein A interaction, *Food Chem.* 339 (2021) 127881. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127881>
139. Z. Wang, H. Gao, J. Cui, S. Zhou, Y. Zhao, C. Ye, J. Li, D. Wu, Two-signal electrochemical detection system for evaluation viability of *Staphylococcus aureus*, *Electrochim. Acta.* 367 (2021) 137258. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.137258>
140. J. Custódio, J.F. Alves, F.M. Silva, E.J.O. von Dolinger, J.G. de S. dos Santos, D. von D. de Brito, Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás, *Rev. Ciênc. Méd.*, 18 (2009) 7–11.
141. S. Chung, L.E. Breshears, A. Gonzales, C.M. Jennings, C.M. Morrison, W.Q. Betancourt, K.A. Reynolds, J.Y. Yoon, Norovirus detection in water samples at the level of single virus copies per microliter using a smartphone-based fluorescence microscope, *Nat. Protoc.* (2021) 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00460-7>