

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

Matheus Silva do Couto

**Biossensor com Grade de Período Longo Funcionalizada com GO e Anticorpos: Uma
Abordagem para Detecção de IL-1 β**

Juiz de Fora

2025

Matheus Silva do Couto

Biossensor com Grade de Período Longo Funcionalizada com GO e Anticorpos: Uma Abordagem para Detecção de IL-1 β

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada

Orientador: Prof. Dr. Welber Gianini Quirino

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

do Couto, Matheus Silva.

Biossensor com Grade de Período Longo Funcionalizada com GO e Anticorpos : Uma Abordagem para Detecção de IL-1B / Matheus Silva do Couto. -- 2025.

88 f. : il.

Orientador: Welber Gianini Quirino

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física, 2025.

1. Biossensor óptico. 2. Óxido de Grafeno. 3. Grades de Fibra de Longo Período. 4. Interleucina-1B. 5. Diagnóstico Biomédico. I. Quirino, Welber Gianini, orient. II. Título.

Matheus Silva do Couto

Biossensor com Grade de Período Longo Funcionalizada com GO e Anticorpos: Uma Abordagem para Detecção de IL-1 β

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada

Aprovada em 28 de novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Welber Gianini Quirino - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Prof. Dr. Marco Cremona
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)

Profa. Dra. Indhira Oliveira Maciel
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Juiz de Fora, 27/11/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Welber Gianini Quirino Membro**, em 02/12/2025, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Indhira Oliveira Maciel Servidor**, em 02/12/2025, às 15:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Marco Cremona Usuário Externo**, em 05/12/2025, às 20:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **27668** e o código CRC **C5D6E10**

*Dedico este trabalho à minha família, minha
mãe e meu irmão por todo suporte e incentivo
que me deram.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e aos meus familiares por todo suporte e capacitação em toda a vida, mas principalmente nesse período da pós-graduação. Agradeço principalmente a minha mãe Angélica e meu irmão Marcus Thadeu por sempre estarem do meu lado. Aos meus tios e primos que sempre estiveram presentes e que eu sempre pude contar com apoio e suas orações.

Agradeço ao professor Dr. Welber Quirino, pela orientação, apoio durante o trabalho, paciência e pela dedicação. Agradeço todos os integrantes do grupo nano e aos professores Indhira, Benjamin, Cristiano pela dedicação ao grupo de pesquisa sempre buscando fazer nossos laboratórios ótimos ambientes de pesquisa. Não posso deixar de agradecer os grupos de pesquisa Litel da engenharia elétrica, o Neem da Química e laboratório de imunologia da biologia pelo suporte na execução desse trabalho.

Aos amigos que fiz na pós-graduação, em especial meus companheiros de laboratório, Anne, Giovanni, Marina, Iuri, Thamires, Daniel e Camila. Sou muito grato ao grupo de pesquisa em biossensores, em especial Sara, João, Leticia e Emily que trabalharam diretamente no desenvolvimento deste trabalho. O suporte e amizade de vocês fez esse período se tornar mais leve e agradável, muito obrigado.

Agradeço muitíssimo a todos os meus amigos mais antigos e os mais recentes que me apoiaram, rezam por mim e são sempre um ombro amigo disponível. Gostaria de colocar o nome de cada um de vocês aqui e se tivesse espaço eu faria, mas saibam que sou extremamente grato a vocês.

E por fim agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora pela formação e crescimento pessoal. Agradeço, também, as agências de fomento que possibilitaram a realização desse trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento de biossensores com alta sensibilidade e seletividade é essencial para o avanço dos diagnósticos biomédicos. Neste trabalho, é apresentada a fabricação e caracterização de um biossensor óptico baseado em grades de período longo (LPG), funcionalizado com óxido de grafeno (GO) e anticorpos anti-IL-1 β , visando a detecção da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β). O biossensor foi funcionalizado com GO e anticorpos por meio da química de ativação com 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxi-succinimida (NHS), além disso, foi encapsulado em uma cápsula microfluídica para testes em meio líquido. A caracterização morfológica da superfície foi realizada por MEV e espectroscopia Raman, confirmando a fixação do GO e a biofuncionalização eficiente. A resposta espectral obtida por um analisador de espectro óptico revelou deslocamentos sistemáticos nos vales ressonantes em função das concentrações de IL-1 β . Observou-se que esses deslocamentos estão relacionados à variação da densidade de carga na camada sensora, causada pela interação antígeno-anticorpo e pelo acúmulo de material biológico alterando a massa, o que altera o índice de refração efetivo da fibra óptica. O biossensor desenvolvido apresentou limites de detecção (LOD) estimados em 21,35 pg/mL e 6,36 pg/mL após a regeneração, valores 3 e 10 vezes melhores que o sensor mais eficiente encontrado na literatura. O dispositivo também demonstrou alta seletividade, com resposta insignificante ao analito inespecífico interleucina-10 (IL-10). Os resultados atestam o potencial do biossensor como ferramenta promissora para aplicações em diagnósticos clínicos, com possibilidade de adaptação para outros biomarcadores e integração em sistemas multiplexados.

Palavras-chave: Biossensor óptico. Óxido de Grafeno. Grades de Fibra de Longo Período. Interleucina-1 β . Diagnóstico Biomédico.

ABSTRACT

The development of biosensors with high sensitivity and selectivity is essential for the advancement of biomedical diagnostics. In this work, the fabrication and characterization of an optical biosensor based on long-period gratings (LPGs), functionalized with graphene oxide (GO) and anti-IL-1 β antibodies, are presented for the detection of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β). The biosensor was functionalized with GO and antibodies through 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) activation chemistry and encapsulated in a microfluidic cartridge for liquid-phase testing. Morphological surface characterization was performed using SEM and Raman spectroscopy, confirming GO deposition and efficient biofunctionalization. The spectral response obtained with an optical spectrum analyzer revealed systematic shifts in the resonant attenuation bands as a function of IL-1 β concentration. These shifts are associated with variations in charge density in the sensing layer, caused by antigen–antibody interactions and biomolecular mass accumulation, which modify the effective refractive index of the optical fiber. The developed biosensor exhibited estimated limits of detection (LOD) of 21.35 pg/mL and 6.36 pg/mL after regeneration, representing improvements of 3- and 10-fold compared to the most efficient sensor reported in the literature. The device also demonstrated high selectivity, showing a negligible response to the nonspecific analyte interleukin-10 (IL-10). These results demonstrate the potential of the proposed biosensor as a promising tool for clinical diagnostic applications, with the possibility of adaptation for other biomarkers and integration into multiplexed sensing systems.

Keywords: Optical biosensor. Graphene oxide. Long-Period Fiber Gratings. Interleukin-1 β . Biomedical Diagnostics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do modelo estrutural para o GO proposto por Lerf-Klinowski com os devidos grupos oxigenados.....	17
Figura 2 - Esquema de estrutura de uma fibra óptica convencional. Um núcleo circular de IR = n_1 e um revestimento $n_2 < n_1$ e uma capa plástica como revestimento.....	27
Figura 3 - Distribuição tridimensional da potência normalizada do modo fundamental LP ₀₁ em uma fibra óptica.	28
Figura 4 - Máquina adaptada para a técnica do arco elétrico.....	30
Figura 5 - Espectro de transmissão típico do sensor, medido à temperatura ambiente.	31
Figura 6 – Equipamentos usados para fabricação da LPG (a) KDC101 - Controlador servo DC K-cube (b) MTS50/M-Z8 - Sistema de deslocamento motorizado 1” Metric.	32
Figura 7 - Imagens (a) H ₂ SO ₄ , KMnO ₄ , NaNO ₃ e do grafite em flocos usados como material de partida; (b) banho de gelo feito durante a mistura dos reagentes; (c) meio reacional após 24 h de reação e (d) após 120 h de agitação constante em temperatura ambiente.	33
Figura 8 - Imagens (a) da transferência da dispersão resultante da primeira etapa de oxidação; (b) dispersão diluída com H ₂ SO ₄ 5 wt% a aproximadamente 80 °C, sob agitação mecânica; (c) dispersão formada explicitando a alteração da cor após decorrido 3 h após o início da segunda etapa de oxidação e (d) pasta sólida, contendo GO e impurezas metálicas residuais do processo de síntese, obtida após as etapas de centrifugação.	34
Figura 9 - Foto da LPG revestida com Óxido de Grafeno, preso em uma barquinha de teflon.....	36
Figura 10 – A esquemática ilustra a produção do biossensor de fibra óptica baseado em LPG revestido com GO: (a) superfície de fibra de sílica LPG com tratamento alcalino; (b) silanização por APTES; (c) deposição de GO; (d) imobilização de IL-1 β via EDC/NHS; (e) passivação de locais disponíveis por solução de bloqueio de BSA; (f) interação de ligação entre o biorreceptor e o analito alvo (anti-IL-1 β).	37
Figura 11 - A imagem mostra o funcionamento de uma rede de Bragg em fibra óptica, que reflete um comprimento de onda específico (λ_B) e transmite os demais, atuando como um filtro óptico baseado no período (Λ) das variações do IR.	38
Figura 12 – (a) Design da estrutura microfluídica (b) Biossensor encapsulado em uma barquinha microfluídica.	39
Figura 13 - A imagem apresenta um esquema de medição óptica com fibra. Uma fonte ELED injeta luz na fibra, que passa por um sensor onde uma micropipeta deposita a amostra. O sinal segue para um OSA e é exibido no computador como gráficos espectrais para análise das variações no comprimento de onda.	40
Figura 14 – (a) MEV do sensor de LPG sem revestimento (b) MEV do sensor de LPG revestido com GO (c) Imagem de MEV do sensor após a conjugação com biomoléculas (d) Imagem com aumento de 10000x da superfície do biossensor.	52
Figura 15 - Espectros Raman do GO rico em carbonila e do biossensor. Todos os espectros foram medidos à temperatura ambiente usando um laser de 532 nm com potência de 5 mW.	53
Figura 16 - Gráfico de comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no anti-IL-1 β , mostrando deslocamento do vale ressonante para comprimentos de onda maiores.....	56
Figura 17 - Gráfico de extrapolação de ajuste de crescimento logístico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no anti-IL-1 β indicando a tendência de estabilização das interações na construção do biossensor.....	57

Figura 18 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no BSA indicando o deslocamento do vale ressonante para comprimentos de onda maiores.	59
Figura 19 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no BSA indicando a tendência de estabilização das interações na construção do biossensor.	60
Figura 20 – Gráfico de potência em função do comprimento de onda para incubação de 500 pg/mL do antígeno ao longo de 8 minutos.	62
Figura 21 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para as diferentes concentrações do anti-IL-1 β , durante o processo de interação ligante. .	63
Figura 22 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito.	64
Figura 23 - Gráfico de dispersão com distribuição estatística e modelo de regressão logística dos vales ressonantes.	65
Figura 24 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para as diferentes concentrações do anti-IL-1 β , durante o processo de interação ligante após a regeneração.	68
Figura 25 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito durante a reutilização.	69
Figura 26 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito durante a reutilização.	70
Figura 27 – Gráfico de dispersão com distribuição estatística e modelo de regressão logística dos vales ressonantes.	71
Figura 28 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito inespecífico.	74
Figura 29 - Gráfico de dispersão com distribuição estatística e modelo de regressão logística dos vales ressonantes para teste inespecífico.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biossensores ópticos com elementos de reconhecimento biológico.....	24
Tabela 2 - Variação do comprimento de onda ressonante (λ) e deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para diferentes concentrações de IL-1 β	66
Tabela 3 - Variação do comprimento de onda ressonante (λ) e deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para diferentes concentrações de IL-1 β	72
Tabela 4 - Biossensores ópticos com elementos de reconhecimento biológico incluindo este trabalho.....	72
Tabela 5 - Variação do comprimento de onda ressonante (λ) e deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para diferentes concentrações de IL-10 (analito controle).	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LPGs	Long-Period Gratings
GO	Óxido de Grafeno
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-10	Interleucina-10
FBG	Fiber Bragg Grating
IR	Índice de refração
SMF-28	Fibra monomodo
wt%	percentual em peso — weight percent em inglês.
AFM	Microscopia de Força Atômica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OSA	Analisador de espectro óptico
SM	Monomodo
APTES	3-Aminopropiltriétoxissilano
CRP	Proteína C-reativa
TiO ₂ -SiO ₂	Titânia-sílica
SPR	Ressonância plasmônica de superfície
dLPG	Grades de período longo de pico duplo.
OS-LPFG	Grade de longo período defasada.
MTLPFG	Long-Period Gratings micro afilado
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
CBA	Cytometric Bead Array
PBS	Tampão fosfato salino
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
NHS	N-hidroxi-succinimida
BSA	Albumina sérica bovina (solução de bloqueio)
LOD	Limite de detecção
HCL	ácido clorídrico
pl	Ponto isoelétrico
R ²	Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	FIBRAS ÓPTICAS COM GRADES DE LONGO PERÍODO (LPG)	14
1.2	ÓXIDO DE GRAFENO.....	16
1.3	INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β).....	18
2	BIOSENSORES ÓPTICOS	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	FABRICAÇÃO DO LPG NA FIBRA ÓPTICA	26
3.2	SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFENO	33
3.3	PREPARO DO BIOSENSOR E INTEGRAÇÃO MICROFLUÍDICA	36
3.4	CARACTERIZAÇÕES DO BIOSENSOR.....	40
3.4.1	Caracterização óptica.....	40
3.4.2	Caracterização estrutural e espectroscópica.....	42
3.5	MECÂNICA DE DETECÇÃO EM BIOSSENSORES ÓPTICOS	43
3.6	BIOAFINIDADE DO ÓXIDO DE GRAFENO	43
3.7	ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO.....	44
3.8	LONG PERIOD GRATING COMO SENSOR.....	46
3.9	EQUAÇÃO DE CRESCIMENTO LOGÍSTICO	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	CARACTERIZAÇÃO	51
4.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	51
4.1.2	Espectroscopia Raman	52
4.2	RESULTADOS DO SENSOR	54
4.2.1	Análise da construção do sensor.....	54
4.2.2	Análise das ligações específicas dos antígenos ao biossensor em operação.....	61
4.2.3	Análise de reutilização.....	66
4.2.4	Análise da citocina controle com biomoléculas inespecíficas.....	73
5	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Diagnósticos rápidos e precisos de doenças são muito importantes para a medicina preventiva, pois reduzem o tempo de obtenção de resultados para os pacientes e orientam planos de tratamento mais adequados¹. O uso de ferramentas de diagnóstico por componentes de reconhecimento biológico, como o *Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA)*², *Cytometric Bead Array (CBA)*³, *Lateral Flow Assays (LFA)*⁴ etc., são dispositivos portáteis para testes rápidos e podem viabilizar a redução de exames desnecessários⁵. Essas ferramentas podem levar a tratamentos mais eficazes e, no caso de doenças infecciosas, diminuir a disseminação dos agentes patológicos, reduzindo custos com saúde⁶. Os biossensores se destacam no meio de autocuidado desde a década de 80 com os testes rápidos de gravidez ou aparelhos de medição de glicose no sangue. Desde então, a imobilização de biomoléculas como elemento de reconhecimento biológico vem sendo amplamente aplicada, embora ainda exista uma busca por transdutores que alcancem limites de detecção (LOD, *Limit of detection*) cada vez menores⁷. Esta pesquisa visa sintetizar, caracterizar e aplicar óxido de grafeno (GO, *Graphene Oxide*) em biossensores para a detecção de doenças infecciosas prevalentes no Brasil⁸. Mais especificamente, este trabalho visa explorar o uso da citocina interleucina-1 β (IL-1 β) como componente de reconhecimento biológico (BRE - *Biorecognition Element*) em um biossensor óptico baseado em Fibras Ópticas gravadas com grades de longo período (LPFG) revestidas com GO visando aumentar sensibilidade e seletividade. Além disso, essa combinação permite que a tecnologia atinja as características desejadas para um dispositivo de detecção compacto, portátil e que ofereça medidas rápidas e precisas⁹.

1.1 FIBRAS ÓPTICAS COM GRADES DE LONGO PERÍODO (LPG)

Uma fibra óptica é um guia de onda dielétrico, geralmente composto por um núcleo central de vidro ou plástico com alto índice de refração (IR) envolto por uma casca com IR mais baixo, permitindo assim a propagação da luz por reflexão interna total entre o núcleo e a casca¹⁰. A propagação da luz em uma fibra óptica não ocorre de forma contínua, mas segundo padrões discretos de distribuição do campo eletromagnético, denominados modos. Esses modos representam as diferentes configurações espaciais possíveis para a

propagação da luz ao longo da fibra. Os modos do núcleo permanecem confinados na região central, enquanto os modos da casca (ou de revestimento) se distribuem em regiões mais externas. A quantidade e a natureza dos modos suportados são determinadas pelas características geométricas da fibra e pela diferença de índices de refração entre o núcleo e a casca¹¹.

Inicialmente desenvolvidas para comunicações, as fibras ópticas são utilizadas para transmitir sinais ópticos a longas distâncias com atenuação mínima e imunidade à interferência eletromagnética¹². Além de seu uso em comunicações, sua estrutura também permite a detecção de variações no ambiente externo, tornando-as úteis como transdutores ópticos capazes de converter interações específicas em um sinal mensurável. Entre os diversos tipos de sensores baseados em fibra, destacam-se as fibras com rede periódica (OFG, *Optical Fiber Grating*) e Redes de Período Longo (LPG, *Long Period Grating*). Esses dispositivos são construídos por meio da modulação periódica do IR ou da geometria da fibra ao longo de seu comprimento. A técnica mais comum para a fabricação de LPGs em fibra ópticas baseia-se na exposição da fibra óptica à luz ultravioleta (UV), por meio de uma máscara de fase ou de um feixe interferente, provocando modificações permanentes no índice de refração do material, especialmente em fibras dopadas com germânio. No entanto, outras abordagens também podem ser empregadas para induzir a modulação periódica, como o aquecimento localizado com laser de CO₂, micro tocha ou arco elétrico, que gera deformações térmicas; a deformação mecânica periódica, obtida pela aplicação controlada de pressão ou curvatura; a irradiação com laser de femtossegundos, capaz de produzir variações precisas do índice de refração em fibras não fotossensíveis; e ainda técnicas baseadas em ablação superficial ou gravação química, que modificam diretamente a geometria da fibra. Todas essas metodologias têm como objetivo criar uma estrutura periódica capaz de promover o acoplamento entre modos do núcleo e modos da casca, princípio fundamental do funcionamento das LPGs¹³.

Essa luz pode ser modulada em intensidade, fase ou frequência para codificar informações. Para a detecção de sinais a LPG atua como um meio sensível a mudanças no ambiente, alterando as propriedades ópticas da luz propagada¹⁴. Nesse contexto, os sensores de fibra óptica, como as LPGs, oferecem muitas vantagens como dimensões reduzidas, rápido tempo de resposta, alta sensibilidade, além de não ser afetado por interferência eletromagnética. Além disso, são plataformas excelentes para biossensores

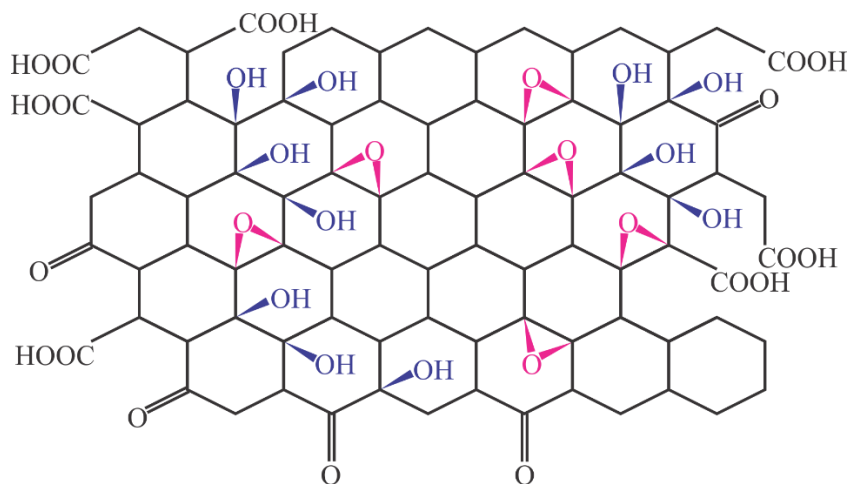
devido à sua sensibilidade intrínseca ao meio externo¹⁵. Ao longo dos anos tem-se aperfeiçoado esse tipo de dispositivo de modo a aumentar sua sensibilidade, por meio de conjugação com nanomateriais diversos, e dentre eles, também o GO¹⁶. Neste trabalho foi empregada a técnica de arco elétrico para a gravação da rede periódica e fabricação das LPGs, que será mais bem detalhada na seção experimental.

1.2 ÓXIDO DE GRAFENO

Nos últimos anos, os avanços no setor tecnológico têm impulsionado de forma significativa a pesquisa e o desenvolvimento de nanomateriais de carbono, com destaque para o GO e sua versão reduzida (rGO, reduced Graphene Oxide). O crescente interesse por esses materiais decorre de suas propriedades únicas, como alta condutividade elétrica, elevada estabilidade mecânica e grande área superficial¹⁷, que os tornam altamente promissores para uma ampla gama de aplicações, incluindo sensores, dispositivos fotovoltaicos orgânicos (OPVs), diodos emissores de luz orgânicos (OLEDs) e dispositivos de armazenamento de energia, como supercapacitores e baterias^{18,19,20}. Um dos métodos de obtenção do GO é através da esfoliação química do grafite. Neste processo, o grafite é submetido a um processo de oxidação em meio ácido que por sua vez promove esfoliação química das camadas do grafite, e o material resultante são folhas estruturadas de átomos de carbono com hibridização sp^2 e sp^3 . Estas folhas são bastante defeituosas em estrutura física, além de terem com grupos funcionais oxigenados inseridos na rede do GO²¹. Segundo o modelo Lerf-Klinowski^{22,23}, na estrutura do GO podem ser encontrados diversos grupos oxigenados como Epóxi (C-O-C), Hidroxilas (OH), Carboxila (COOH), Carbonila (=O)²⁴ (Figura 1).

O método de síntese do GO foi proposto por J. Hummers et al.²⁵, e depois dele modificações desse método foram propostas por outros pesquisadores²⁶⁻²⁸. De forma geral, o grafite tratado com ácido sulfúrico e permanganato de potássio promove a formação de e OH na superfície do GO enquanto os grupos COOH e =O se formam nas bordas das folhas. Esse processo insere oxigênio entre as camadas do grafite e rompe as ligações abrindo espaço para os grupos funcionais. Esse processo promove também a modificação da rede cristalina pela hibridização $sp^2 \rightarrow sp^3$. Como consequência, o GO apresenta maior desordem estrutural e aumento do *bandgap* comparado ao grafeno puro²⁹.

Figura 1 - Representação do modelo estrutural para o GO proposto por Lerf-Klinowski com os devidos grupos oxigenados.



Fonte: Adaptado da referência³⁰.

Do ponto de vista dos biossensores, os grupos funcionais oxigenados na rede do GO podem participar de interações químicas de acoplamento com as proteínas presentes em anticorpos³¹. Em especial, o grupo carboxila pode ser ativado, utilizando a ligação cruzada EDC/NHS³². O sistema EDC/NHS é um método de ativação química amplamente empregado para promover ligações covalentes entre grupos carboxila (-COOH) e amina (-NH₂), no qual o EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) atua ativando o grupo carboxila para formar um intermediário reativo, enquanto o NHS (N-hidroxisuccinimida) estabiliza esse intermediário, permitindo sua posterior reação com grupos amina de biomoléculas, resultando em ligações amida estáveis, etapa fundamental em processos de biofuncionalização de superfícies, como no caso do GO em biossensores³³. Além disso, a presença dos outros grupos funcionais faz do GO um material extremamente propício à biofuncionalização, facilitando a imobilização de biomoléculas específicas (como proteínas, enzimas, anticorpos, DNA, etc.) à sua superfície, aumentando assim a seletividade e a sensibilidade do sensor^{34,35}. A ligação entre os grupos funcionais do GO e biomoléculas resulta em estruturas estáveis, ideais para aplicações em biossensores e plataformas de detecção.

1.3 INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β)

As citocinas são proteínas multifuncionais de baixo peso molecular secretadas por vários tipos de células e desempenham um papel crucial na modulação da resposta imune³⁶. As citocinas não são exclusivas de humanos, elas são produzidas por muitos organismos multicelulares, incluindo outros mamíferos, aves, peixes, répteis e até alguns invertebrados. Essas moléculas fazem parte de um mecanismo de comunicação celular universal do sistema imunológico, regulando processos como inflamação, defesa contra patógenos, cicatrização e diferenciação celular. Elas atuam por meio da ligação a receptores específicos nas membranas das células-alvo, desencadeando uma série de reações intracelulares que guiam as células até os locais de infecção. O monitoramento dos níveis de citocina no organismo tem alta relevância clínica devido às propriedades como alta especificidade e capacidade de induzir respostas relevantes em baixíssimas concentrações³⁷. Mais especificamente, podemos citar, por exemplo, a forte correlação entre os níveis de citocinas, seus padrões pró-inflamatórios indicados pelo excesso de IL-1 β , e a progressão de doenças como artrite reumatoide³⁸ ou doenças cardiovasculares³⁹, além de sua associação com a progressão de diversas doenças, incluindo câncer⁴⁰, COVID-19⁴¹ e até mesmo transtornos mentais⁴². Essas proteínas estão disponíveis em tecidos periféricos, como o sangue⁴³ tornando-a um alvo promissor como biomarcador de diagnóstico, no monitoramento e prevenção de doenças e no acompanhamento da evolução de tratamentos⁴⁴.

Com a recente pandemia de COVID-19, o papel das citocinas ganhou um entendimento muito mais aprofundado⁴⁵. Essa doença evidenciou como a ativação desregulada da resposta imune pode levar a níveis elevados de citocinas inflamatórias no sangue, como a *interleucina-6* (IL-6), *Fator de Necrose Tumoral α* (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1)⁴⁶. Como dito acima, o aumento de citocinas no sangue também está associado a outras doenças, incluindo distúrbios autoimunes, doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e casos graves de infecções virais, onde as tempestades de citocinas estão associadas a desfechos clínicos piores^{47,48}. Assim, podemos entender as citocinas como proteínas sinalizadoras produzidas pelas células do sistema imunológico reguladoras de processos inflamatórios⁴⁹. Atualmente, o método mais comumente empregado para medir citocinas em amostras clínicas e de pesquisa baseia-se na ligação antígeno-anticorpo, especificamente o *ELISA*². Embora outros métodos de medição, como ensaios multiplex como o CBA³, estejam disponíveis, essas técnicas apresentam limitações, incluindo a necessidade de pessoal

treinado, equipamentos específicos e alto custo. Como alternativa, a pesquisa com biossensores tem ganhado cada vez mais espaço para explorar potenciais aplicações no monitoramento do nível de citocinas⁵⁰.

O presente trabalho se propõe a verificar a viabilidade de biossensores ópticos baseados em LPGs revestidas com GO, conjugados com anticorpos (anti-IL-1 β), como alternativa para o ELISA. Analisando os resultados de operação do biossensor na presença do antígeno-alvo, a citocina pró-inflamatória IL-1 β para as mesmas concentrações usadas no ELISA⁵¹. Considerando sua relevância como biomarcadores de resposta imune, o objetivo deste estudo é avaliar a capacidade do nosso biossensor de detectar a IL-1 β com alta sensibilidade. Ao comprovar sua eficácia como biossensor para IL-1, este dispositivo demonstra seu potencial para ser adaptado à detecção de outros biomarcadores associados a diversas doenças, expandindo suas possíveis aplicações em diagnósticos futuros.

2 BIOSSENSORES ÓPTICOS

DeLisa et al.⁵², no ano de 2000, desenvolveram uma das primeiras aplicações de OFG como imunossensor, para detectar imunoglobulina G humano (IgG), geralmente encontrada no sangue, utilizando anticorpos anti-IgG humano. Em seu trabalho, DeLisa demonstrou que uma LPG funcionalizada com silano (APTES) e 0,5 mg/mL de anti-IgG imobilizado na superfície da fibra permitiu o reconhecimento específico do analito IgG humano em diferentes concentrações. Esta montagem obteve na época um LOD de 0,7 µg/mL^{53,52}. Como proteínas controle, foram usadas a interleucina-2 (IL-2) humana e albumina sérica bovina (BSA) para demonstrar a especificidade do biossensor. Em ambos os casos, essas proteínas não provocaram alterações no sinal espectral nas concentrações avaliadas, comprovando a seletividade do sensor apenas para anti-IgG.

Sridevi et al.⁵⁴, em 2015, apresenta um sensor FBG altamente sensível para a detecção da proteína C-reativa (CRP, *C-Reactive Protein*), é uma proteína também utilizada como marcador inflamatório. Esse sensor apresenta funcionamento semelhante ao da LPG, no sentido de que ambas operam com base no monitoramento do deslocamento espectral do sinal que atravessa a fibra, como função da concentração de analito adicionado à superfície do sensor. A FBG revestida com GO e funcionalizada com anticorpos anti-CRP demonstrou alta sensibilidade em comparação com métodos convencionais, atingindo um LOD de 0,01 mg/mL. Além disso, o dispositivo mostrou alta especificidade para CRP, mesmo na presença de interferentes não específicos como ureia, creatinina e glicose.

Chiavaioli et al.⁵⁵ em seu artigo de 2015 apresenta um biossensor óptico baseado em LPGs revestidas com um filme fino de titânia-silica (TiO₂-SiO₂) produzido por sol-gel. O biossensor foi funcionalizado com um polímero de metacrilato, permitindo a imobilização de anticorpos para a detecção de IgG humana. A interação entre IgG e anti-IgG, assim como os exemplos anteriores, foi monitorada por deslocamento do comprimento de onda de Bragg¹, demonstrando alta sensibilidade e especificidade, mesmo em soro humano. O LOD atingido foi da ordem de 1 ng/mL.

¹ O comprimento de onda de Bragg é o comprimento de onda que é refletido de forma seletiva por uma estrutura periódica, como uma rede de Bragg em fibra, devido à interferência construtiva da luz espalhada ao longo da rede, sendo sensível a variações físicas do meio

No ano seguinte Coelho et al.⁵⁶ publicam a comparação entre dois métodos de detecção de trombina, uma enzima produzida no fígado essencial no processo de coagulação do sangue, sua detecção pode auxiliar na identificação de condições como hemofilia⁵⁷. O estudo usando LPGs revestidas com dióxido de titânio (TiO_2) e de ressonância plasmônica de superfície (SPR) com camadas de ouro e dióxido de titânio. O desempenho dos dois sensores na faixa de concentração de 0,37 a 3,7 ng/mL, demonstram um LOD de aproximadamente 0,37 ng/mL. Ambos os métodos apresentam a capacidade de regeneração, ou seja, é possível revitalizar o sensor, lavando e fazendo uma nova deposição do aptâmero², permitindo reutilização para quantificação de trombina. Para a regeneração após cada ensaio, os sensores eram lavados com solução de hipoclorito a 5% por 30 minutos, o que removia o aptâmero e deixava a superfície pronta para uma nova funcionalização.

Um biossensor óptico baseado em grades de período longo de pico duplo (dLPG) também funcionalizadas com GO, foi proposto por Liu et al.(2017)⁵⁸. Ao gravar uma LPG no núcleo da fibra, forma-se uma estrutura periódica que acopla parte da luz em diferentes modos de revestimento, cada um com uma ressonância própria. Em geral, para as fibras mencionada nos trabalhos anteriores, se observa somente um pico ressonante, mas a geometria da fibra pode permitir o acoplamento simultâneo de dois modos distintos, cada um em um comprimento de onda ligeiramente diferente formando então uma dLPG. A camada de GO proporciona uma plataforma eficaz para a fixação das biomoléculas, participando de ligações químicas entre os grupos funcionais e as proteínas, e amplifica o sinal da interação entre antígeno-anticorpo devido às suas propriedades ópticas e bioquímicas³³. O dispositivo neste trabalho de Liu et al. demonstrou uma alta sensibilidade na detecção de imuno-complexos, atingindo um LOD de 7 ng/mL, muito superior a sensores similares não revestidos com GO. Este trabalho propõe também a reutilização do sensor aplicando um processo de regeneração química, usando uma solução de HCl 0,01 M. A reutilização de biossensores é altamente desejável, uma vez que um mesmo dispositivo pode acompanhar um paciente ao longo do tratamento, cortando custos de operação.

² É uma pequena molécula de DNA, RNA ou peptídeo que se dobra em estruturas específicas e se liga com alta afinidade e seletividade a um alvo (proteína, íon ou célula).

Um dispositivo desenvolvido com uma grade de longo período defasada (OS-LPFG) conjugada com GO foi proposto por Lee et al. (2021)⁵⁹. Este dispositivo foi usado para medir níveis de glicose, usando glicose oxidase como BRE. Os testes foram feitos para uma faixa de concentração de 0,9 a 4,5 mg/mL, alcançando um LOD de 0,9 mg/mL. Neste trabalho realizou-se um teste com o sensor sem adição de nenhum revestimento como os comumente usados (APTES, GO, TiO₂-SiO₂, TiO₂ etc.), ou seja, somente a fibra decapada de sua proteção na presença da concentração do analito alvo. Demonstrou-se então que o biossensor não apresentou variação significativa como função da concentração do analito, confirmando que a presença dos revestimentos de GO e do BRE são essenciais para uma detecção correta e sensível.

Em 2023 kang et al.⁶⁰, desenvolveu um sensor de LPG microafilado (MTLPFG) também revestido com GO. A LPG, antes do revestimento é gravada usando um laser de CO₂, em um processo de inscrição térmica, que gera modulações profundas no seu IR melhorando o acoplamento entre os modos de propagação. Em seguida o sensor passa por uma modificação do seu revestimento ativando os grupos carboxila do GO com uma solução de EDC e com NHS tornando o sensor mais propenso a conjugação biológica. Nesse trabalho o biossensor usado para detectar pepsina, uma enzima digestiva responsável por quebrar proteínas dos alimentos, em concentrações que variaram de 1 ng/mL a 1000 ng/mL obtendo um LOD de 25,79 ng/mL em comparação ao mesmo sensor sem revestimento de GO apresentou um LOD de 104,6 ng/mL. Após cada medição, o sensor foi lavado com etanol e água DI e depois seco em vácuo, permitindo novo uso. Foram realizados ao todo 3 ciclos completos de detecção com resultados muito próximos entre si.

Mais recentemente, em 2025 Soares et al.⁶¹ desenvolveram um sensor também baseado no complexo LPG+GO revestido com anti-cortisol, usado para detectar cortisol em concentrações variando de 0,01 ng/mL até 100 ng/mL. O cortisol é um hormônio esteroide produzido pelas glândulas suprarrenais responsável por regular o uso dos carboidratos pelo organismo. Esse sensor alcançou o LOD de 60 pg/mL. Além disso, foram realizados teste de detecção cruzada com outras moléculas como testosterona e glicose, as quais apresentaram uma resposta insignificante, provando a seletividade do dispositivo.

A Tabela 1 apresenta uma síntese de diferentes biossensores ópticos reportados na literatura, com foco nos elementos de transdução utilizados, revestimentos aplicados, LOD

e faixa de concentração dos testes. A versatilidade das estruturas ópticas na construção dos sensores é evidenciada pela diversidade de configurações encontradas na literatura.

Tabela 1 - Biossensores ópticos com elementos de reconhecimento biológico.

Transdutor	Revestimento	LOD	Intervalo de detecção	Ano	Referência
LPG	APTES	0,7 µg/mL	5 – 50 µg/mL	2000	DeLisa 2000
FBG	GO	0,01 mg/mL	1 – 100 µg/mL	2015	SRIDEVI 2015
LPG	TiO ₂ -SiO ₂	1 ng/mL	5 – 50 µg/mL	2015	CHIAVAIOLI 2015
LPG	TiO ₂	0,37 ng/mL	0,37 - 3,7 µg/mL	2016	COELHO 2016
SPR	TiO ₂	0,37 ng/mL	0,37 - 3,7 µg/mL	2016	COELHO 2016
dLPG	GO	7 ng/mL	1 – 100 µg/mL	2017	LIU 2017
OS-LPFG	GO	0,9 mg/mL	0,9 – 4,5 mg/mL	2021	LEE 2021
MTLPFG	GO	25,79 ng/mL	1 – 1000 ng/mL	2023	Kang 2023
MTLPFG		104,6 ng/mL	1 – 1000 ng/mL	2023	Kang 2023
LPG	GO	60 pg/mL	0,01 – 100 ng/mL	2025	SOARES 2025

Fonte: O Autor.

Como visto nesse capítulo, os dispositivos baseados em LPGs são amplamente encontrados na literatura dos últimos 25 anos indicando acessibilidade, robustez e sensibilidade com o revestimento adequado para cada aplicação. A progressão dos LODs ao longo dos anos mostra uma evolução significativa desde os anos 2000 com limites micromolares até o mais recente com detecção a picogramas por mililitro. Essa melhoria está fortemente associada à incorporação de nanomateriais. O APTES e o GO aparecem mais frequentemente pela sua capacidade de promover ancoragem eficiente de biomarcadores e por sua capacidade de amplificar o sinal por meio da modificação no IR na superfície da fibra. O presente trabalho apresenta um sensor com LOD de aproximadamente 21,64 pg/mL no teste inicial e 6,40 pg/mL na reutilização do sensor regenerado, para a detecção do IL-1 β , o que o posiciona junto aos dispositivos mais sensíveis já reportados.

Em suma, os biossensores ópticos vêm se consolidando como ferramentas essenciais na detecção de alvos biológicos e químicos devido à sua alta sensibilidade, seletividade e possibilidade de miniaturização. Diferentemente dos métodos convencionais, como o ELISA e o CBA, esses sensores permitem análises rápidas, sem marcação e em tempo real, o que os torna ideais para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental e aplicações industriais.

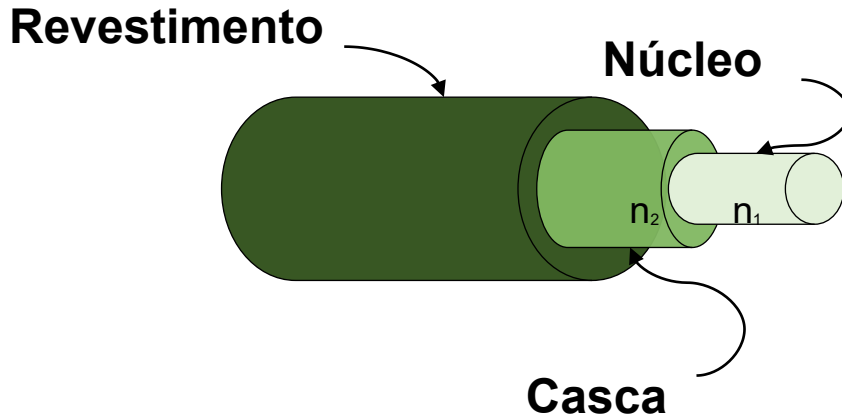
Com o avanço das tecnologias de nanomateriais e fibras ópticas, novas arquiteturas como FBGs, LPGs e interferômetros vêm sendo amplamente exploradas como transdutores. Além disso, a funcionalização dessas estruturas com materiais como GO, nanopartículas metálicas e polímeros permite a obtenção de limites de detecção na faixa de picogramas por mililitro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FABRICAÇÃO DO LPG NA FIBRA ÓPTICA

Uma fibra óptica consiste em um guia de onda dielétrico projetado para operar em frequências ópticas correspondentes à região do espectro eletromagnético que abrange aproximadamente de 10^{14} a 10^{15} Hz (ou comprimentos de onda entre 0,3 e 3 μm). Para aplicações em telecomunicações, no entanto, utilizam-se predominantemente as chamadas janelas de transmissão óptica, localizadas na faixa do infravermelho próximo, devido à baixa atenuação e dispersão nesse intervalo, sendo os comprimentos de onda mais comuns em aplicações práticas, em torno de 850 nm, 1310 nm e 1550 nm. Como descrito anteriormente, uma fibra óptica é um guia de onda dielétrico formado por um núcleo de vidro ou plástico de maior índice de refração, envolto por uma casca com índice menor. Essa diferença permite que a luz seja guiada por meio da reflexão interna total entre as duas regiões. A luz não se propaga de forma contínua, mas em padrões discretos do campo eletromagnético chamados modos, que correspondem às possíveis distribuições espaciais da propagação óptica. Os modos do núcleo permanecem confinados na região central, enquanto os modos da casca se estendem para áreas mais externas. O número e o tipo de modos existentes dependem da geometria da fibra e do contraste entre os índices de refração do núcleo e da casca⁶². Cada camada exerce uma função específica: o núcleo é responsável pela condução da luz; a casca garante o confinamento do campo óptico no interior do núcleo por meio do fenômeno da reflexão interna total; e o revestimento atua como elemento de proteção mecânica, conferindo robustez e flexibilidade à fibra (Figura 2)⁶³. Esse conjunto possibilita a transmissão eficiente da radiação eletromagnética guiada ao longo da estrutura, minimizando perdas e assegurando elevada capacidade de transporte de informação.

Figura 2 - Esquema de estrutura de uma fibra óptica convencional. Um núcleo circular de IR = n_1 e um revestimento $n_2 < n_1$ e uma capa plástica como revestimento.



Fonte: O Autor.

Cada modo de propagação é uma solução específica da seguinte função de onda,

$$\nabla^2 \mathbf{E} + n^2(\omega)k_0^2 \mathbf{E} = 0, \quad (1)$$

na qual \mathbf{E} representa o campo elétrico complexo, n é o índice de refração e $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ o número de onda⁶⁴. Essa equação de onda deriva diretamente das equações de Maxwell em meio dielétrico e linear. A combinação dos operadores de Maxwell leva a essa relação que evidencia que n e o k_0 descrevem como os modos se estabelecem na fibra⁶⁵. Pela geometria cilíndrica da fibra, é possível reescrever a equação em coordenadas cilíndricas como,

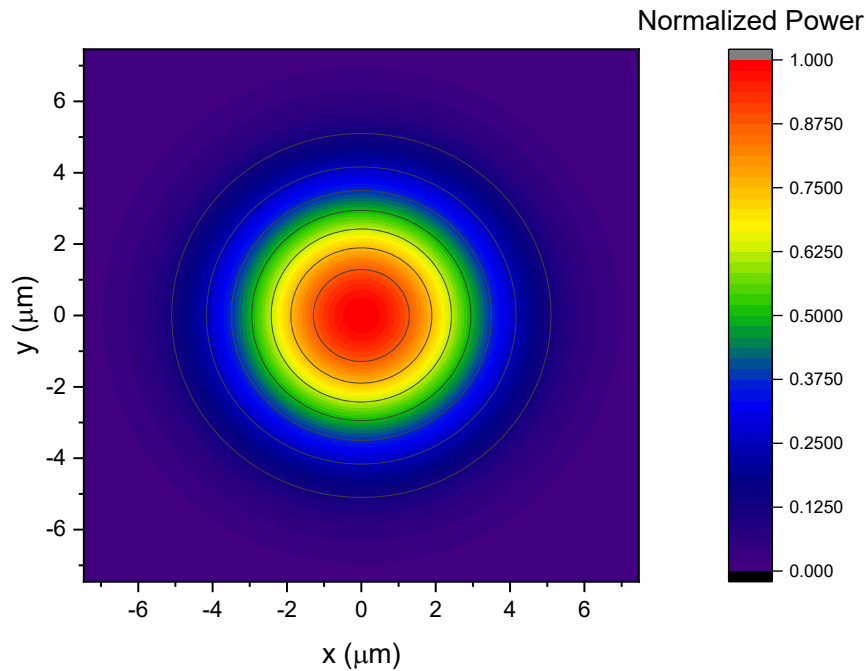
$$\frac{\partial^2 E_z}{\partial \rho^2} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial E_z}{\partial \rho} + \frac{1}{\rho^2} \frac{\partial^2 E_z}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z^2} + n^2 k_0^2 E_z = 0, \quad (2)$$

cuja com solução natural envolve as funções de Bessel. Que descreve a variação radial do campo eletromagnético dentro do núcleo e do revestimento.

As soluções (modos) são permitidas pelas condições de contorno impostas pela geometria do núcleo e a diferença no IR entre o núcleo e a casca. No caso das fibras monomodo, o diâmetro reduzido do núcleo restringe a propagação ao modo fundamental (LP_{01}), fazendo a luz ser guiada por apenas um modo paralelo ao eixo central da fibra⁶⁶. Como ilustrado na Figura 3, a distribuição tridimensional da potência apresenta um único máximo centrado no núcleo, com perfil aproximadamente gaussiano e decaimento radial

suave em direção à casca. Essa simetria axial e a ausência de estruturas modais adicionais caracterizam o LP_{01} como o modo fundamental da fibra óptica⁶⁷.

Figura 3 - Distribuição tridimensional da potência normalizada do modo fundamental LP_{01} em uma fibra óptica.



Fonte: O Autor.

Tomando ϕ como constante e $E(\rho, \phi, z) = R(\rho) \cdot e^{i\beta z}$, na qual β é a constante de propagação definida por,

$$\beta = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot n_{eff}, \quad (3)$$

podemos então reescrever a equação 2 como a equação 4,

$$\frac{\partial^2 R(\rho)}{\partial \rho^2} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial R(\rho)}{\partial \rho} + (n^2 k_0^2 - \beta^2) R(\rho) = 0. \quad (4)$$

Para obter a constante de propagação tomamos a definição de IR efetivo ($n_{eff} = \frac{\beta}{k_0}$) e do número de onda ($k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$)⁶⁸. Com a definição dos parâmetros de separação dentro e fora do

núcleo mostrado na equação 5 chegamos às soluções da equação de Bessel equação 6 onde a é o raio, J e K são funções de Bessel⁵⁵.

$$\rho = \begin{cases} u^2 = a^2(n_1^2 k_0^2 - \beta^2), & \rho \leq a \\ w^2 = a^2(\beta^2 - n_2^2 k_0^2), & \rho \geq a \end{cases} \quad (5)$$

$$R(\rho) = \begin{cases} R(\rho) = J_m\left(\frac{u\rho}{a}\right), & \rho \leq a \\ R(\rho) = K_m\left(\frac{w\rho}{a}\right), & \rho \geq a \end{cases} \quad (6)$$

Usando a condição de contorno, a exigência de continuidade dos campos elétricos e magnéticos tangenciais $\rho = a$ obtemos a equação a seguir:

$$\frac{J_m(u)}{uJ_1(u)} = -\frac{K_0(w)}{wK_1(w)}. \quad (7)$$

Dessa forma, os modos de propagação podem ser caracterizados por combinações dessas funções, determinando o perfil de campos transversais. Nas fibras monomodo, a disposição exclusivamente do modo LP_{01} apresenta um perfil de campo concentrado no núcleo com penetração evanescente na casca.

Essas equações descrevem matematicamente as condições para a existência e propagação dos modos guiados em fibras ópticas, relacionando a geometria do núcleo, os índices de refração envolvidos e a frequência da radiação com as distribuições espaciais do campo eletromagnético. Em particular, a imposição das condições de contorno leva às equações características que determinam os valores permitidos para a constante de propagação β e, conseqüentemente, para o índice efetivo n_{eff} . Dessa forma, tais resultados fornecem a base para compreender o regime monomodo, identificar quais modos podem se propagar e prever como a luz será confinada e transmitida ao longo da fibra. Em um contexto mais amplo, essas soluções são fundamentais para o projeto e otimização de fibras ópticas aplicadas em sensoriamento, uma vez que permitem correlacionar as propriedades estruturais da fibra com seu desempenho óptico.

A fibra óptica monomodo (SMF-28), usada nesse trabalho, é gravada com grade de longo período utilizando a técnica de arco elétrico⁶⁹. Essa técnica consiste em criar deformações na superfície da fibra, usando uma máquina de fusão de fibras ópticas modificada com dois eletrodos alinhados (Figura 4). O revestimento da fibra é retirado para garantir a marcação

da casca e do núcleo, a fibra é posicionada na máquina entre dois eletrodos para ser submetida a uma descarga elétrica gerando uma deformação da casca, provocando um acoplamento entre os modos de propagação direto do núcleo com a casca, o que causa uma mudança no IR local⁷⁰. Esse arco se repete ao longo da fibra, espaçado com período da grade $\Lambda = 550 \mu\text{m}$. Em fibras monomodo, uma modulação periódica do IR local introduz um vetor de casamento onda ($2\pi/\Lambda$) que compensa a diferença de número de onda, das constantes de propagação, entre os modos da casca e do núcleo como descreve a (8) equação a seguir,

$$\beta_{\text{núcleo}} - \beta_{\text{casca}} = \frac{2\pi}{\Lambda}. \quad (8)$$

Reorganizando os termos dessa equação obtemos a relação do comprimento de onda ressonante,

$$\lambda_{\text{res}} = (n_{\text{núcleo}} - n_{\text{casca}}) \cdot \Lambda, \quad (9)$$

onde a diferença entre os índices de refração é o índice de refração efetivo dado pela diferença entre os índices de refração da casca e do núcleo,

$$\Delta n_{\text{eff}} = n_{\text{núcleo}} - n_{\text{casca}}. \quad (10)$$

Figura 4 - Máquina adaptada para a técnica do arco elétrico.



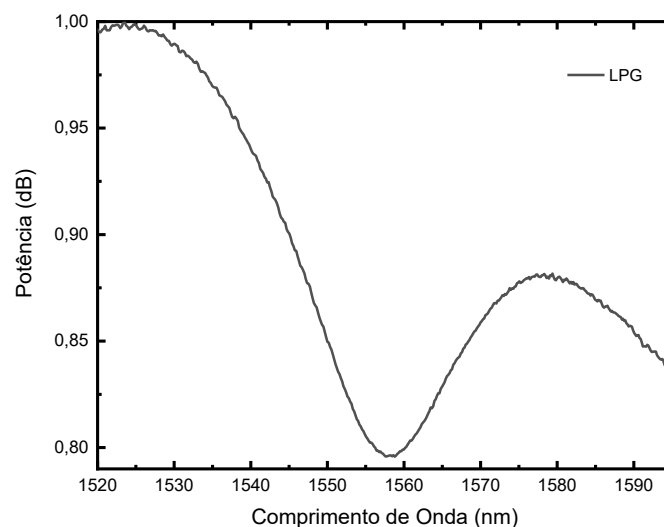
Fonte: Imagem disponibilizada por Laboratório de Instrumentação e Telemetria (LiTel).

O comprimento de onda ressonante é um comprimento de onda específico no qual um sistema físico apresenta uma resposta máxima, resultando em uma maior intensidade de transmissão. O acoplamento promovido entre os modos de propagação na LPGs resulta em um espectro de transmissão que contém bandas de atenuação centradas em um comprimento de onda específico que corresponde a um acoplamento de um modo da casca. Para a fibra usada nesse trabalho usamos $n_{\text{núcleo}} \approx 1,45$, que é o índice efetivo do modo do núcleo $n_{\text{casca}} = 1,46$, que é o índice efetivo do modo da casca e $\Lambda = 500\mu\text{m}$ como o período da rede LPG (distância entre as marcações)⁷¹. Substituindo esses valores encontrados no datasheet da fibra⁷² na equação 9, $\lambda_{res} = (1,4492 - 1,4461) \cdot 500 \cdot 10^{-6}$, obtemos o comprimento de onda ressonante (λ_{res}),

$$\lambda_{res} \approx 1550 \text{ nm.} \quad (11)$$

Esse comprimento de onda ressonante é representado pelo vale no espectro de luz transmitido representado na Figura 5⁷³. Esse fenômeno é fundamental para a ocorrência de sensoriamento, ao permitir detectar variações com alta precisão monitorando a variação da posição desse comprimento de onda ressonante como função da variação da concentração. Neste trabalho chamaremos de comprimento de onda ressonante o vale localizado entre 1555 e 1560 nm. Esse vale ressonante será monitorado como função das modificações feitas na superfície do sensor⁷⁴.

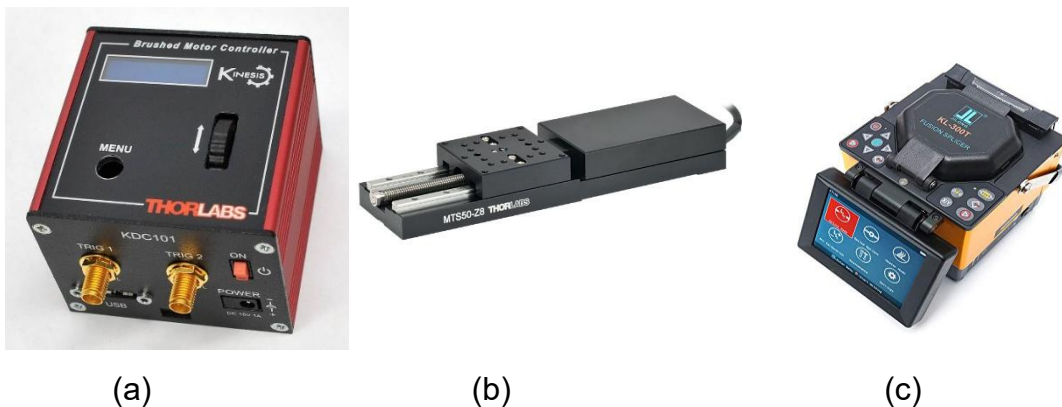
Figura 5 - Espectro de transmissão típico do sensor, medido à temperatura ambiente.



Fonte: O Autor.

A gravação da LPG foi feita usando o sistema adaptado que vimos na Figura 4 composto pelos seguintes elementos: um controlador Servo mecânico DC K-cube KDC101⁷⁵, responsável por controlar com precisão o deslocamento da fibra garantindo a periodicidade desejada nas marcações (Figura 6.a); um sistema de deslocamento motorizado⁷⁶, (Figura 6.b) da Thorlabs composto por um trilho, cuja função é movimentar linearmente a fibra durante o processo de gravação; uma fusion splicer *Jilong KL-300T*, (Figura 6.c) devidamente adaptada, com os eletrodos que desempenham os arcos elétricos controlados, usados para formar deformações na fibra. Essa configuração auxilia a manter a fibra tensionada, alinhada e garantindo a aplicação do arco elétrico ao longo da sessão da fibra.

Figura 6 – Equipamentos usados para fabricação da LPG (a) KDC101 - Controlador servo DC K-cube (b) MTS50/M-Z8 - Sistema de deslocamento motorizado 1" Metric.



Fonte: Imagem disponíveis em thorlabs.com

Esse arranjo garante não só a estabilidade da fibra, mas também que as marcações sejam devidamente executadas com o espaçamento desejado. Durante a marcação da LPG, além do período, o comprimento e as condições do ambiente são também responsáveis por definir os modos de acoplamento e por consequência o espectro de transmissão analisado em tempo real, observando a formação do vale ressonante.

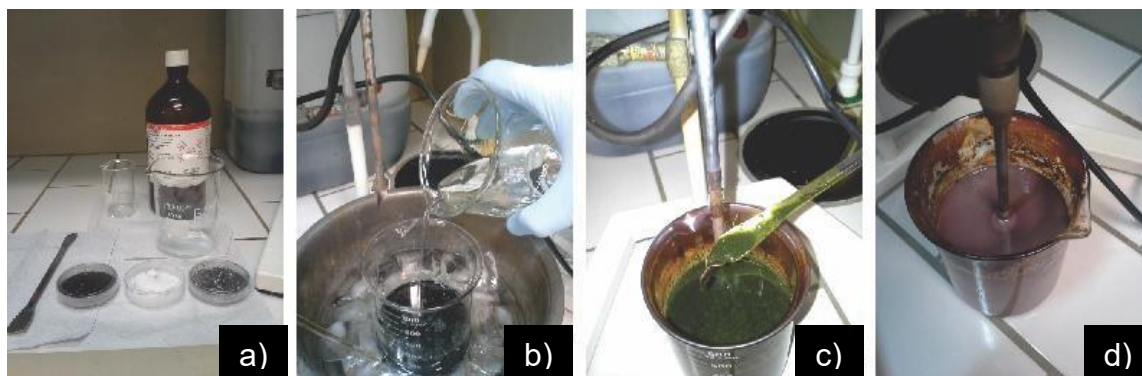
3.2 SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFENO

O GO utilizado neste estudo foi sintetizado pelo método de Hummers modificado²⁵, que incluiu duas etapas de oxidação com tempo prolongado. Essas duas etapas são aplicadas para garantir uma esfoliação e oxidação mais eficiente de modo que favoreça a formação de GO com altas quantidades de grupos funcionais carbonila⁷⁷. Após o primeiro tratamento químico, o GO é posto em agitação mecânica prolongada para aumentar o grau de esfoliação. Logo em seguida, recebe um segundo tratamento químico sob temperatura, o que favorece o recomeço do processo de oxidação e por consequência o surgimento dos grupos oxigenados. Esse processo leva à introdução de grupos oxigenados entre as camadas do grafite, aumentando o espaçamento interplanar. O aumento da distância facilita a entrada de moléculas de água entre as folhas, reduzindo as interações de Van der Waals, resultando na obtenção de folhas mais separadas em meio aquoso⁷⁸.

O grafite foi usado como precursor, e os reagentes incluíram ácido sulfúrico (H_2SO_4), permanganato de potássio ($KMnO_4$) e nitrato de sódio ($NaNO_3$). A reação entre H_2SO_4 e $KMnO_4$ produz heptóxido dimanganês (Mn_2O_7), um agente oxidante altamente reativo, que interage com as ligações C=C no plano basal do grafite, promovendo a inserção de grupos oxigenados e, conseqüentemente, a oxidação e esfoliação das camadas de grafite²⁴.

Em um béquer, são misturados o H_2SO_4 , grafite em flocos e nitrato de sódio os reagentes são mostrados na Figura 7.a. A mistura é submetida a agitação mecânica e deve ser levada ao banho de gelo para controlar a temperatura da reação, preparando-a para a próxima etapa (Figura 7.b). Em seguida, quando a temperatura estiver próxima de $5^\circ C$, é adicionado o $KMnO_4$, gradualmente, no período de 1 hora (Figura 7.c). Após 2 horas, a mistura deve ser retirada do banho de gelo e mantida sob agitação à temperatura ambiente por 120 horas (Figura 7.d). Essa etapa promove uma oxidação lenta, contínua e controlada, auxiliando na penetração gradual dos agentes oxidantes entre as camadas do grafite.

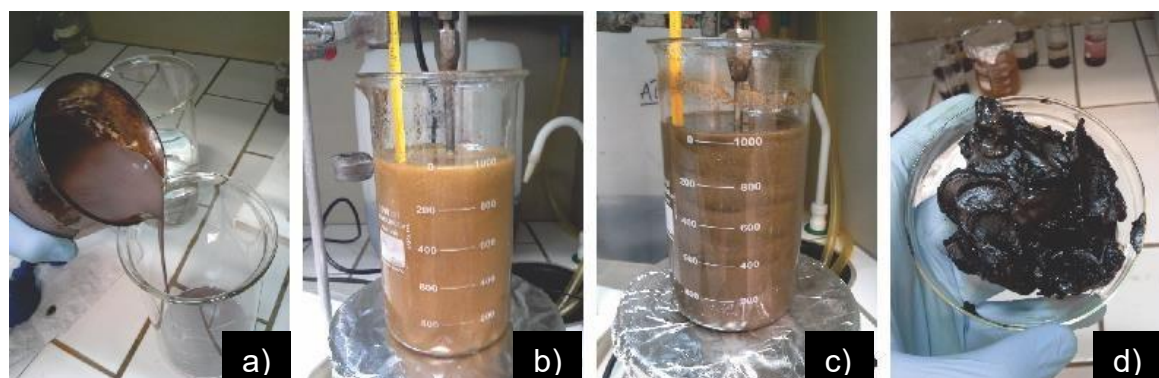
Figura 7 - Imagens (a) H_2SO_4 , $KMnO_4$, $NaNO_3$ e do grafite em flocos usados como material de partida; (b) banho de gelo feito durante a mistura dos reagentes; (c) meio reacional após 24 h de reação e (d) após 120 h de agitação constante em temperatura ambiente.



Fonte: adaptada da referência Lima et al. 2017³⁰.

Após as 120 horas, a dispersão foi transferida para um béquer maior (Figura 8.a) e posteriormente aquecida. Iniciando a segunda etapa de oxidação, foi adicionado lentamente 700 mL de uma solução de 5 wt% em H_2SO_4 , durante 1 hora, responsável por ativar os íons remanescentes do KMnO_4 (Figura 8.b). Em seguida, toda a dispersão é mantida sob agitação mecânica e à temperatura de 80°C por um período de 2 horas (Figura 8.c). O aquecimento em meio ácido acelera a hidrólise ácida ativando o oxigênio do anel epóxi, o que causa sua abertura, resultando em grupos carbonila na superfície²⁷. Em seguida, a temperatura foi reduzida para 60°C , sendo adicionados 15 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30%, interrompendo o processo de oxidação. Essa mistura foi deixada em repouso por 12 horas, a fim de maximizar a reação com os íons presentes no GO. Após o descanso, a dispersão foi centrifugada para precipitar o GO, resultando em uma pasta escura (Figura 8.d).

Figura 8 - Imagens (a) da transferência da dispersão resultante da primeira etapa de oxidação; (b) dispersão diluída com H_2SO_4 5 wt% a aproximadamente 80°C , sob agitação mecânica; (c) dispersão formada explicitando a alteração da cor após decorrido 3 h após o início da segunda etapa de oxidação e (d) pasta sólida, contendo GO e impurezas metálicas residuais do processo de síntese, obtida após as etapas de centrifugação.



Fonte: adaptada da referência Lima et al. 2017³⁰.

A pasta resultante deve ser purificada, para remover as impurezas inorgânicas. Foi adicionada uma solução de 5 wt% de H_2SO_4 e 0,5 wt% de H_2O_2 . A mistura foi agitada mecanicamente para homogeneizar e levada ao ultrassom de ponta para auxiliar na esfoliação do GO. O produto obtido desse processo foi novamente centrifugado a fim de promover a precipitação do GO, sendo esse procedimento repetido outras duas vezes. Novamente três outros enxágues foram feitos, desta vez usando a solução de 3 wt% de ácido clorídrico (HCL). Essa etapa de purificação serviu para eliminação das impurezas metálicas residuais.

As purificações seguintes foram feitas somente com água deionizada seguindo mesmo processo. Essa etapa deve ser repetida até que o sobrenadante atinja o pH próximo do neutro. Ao final da purificação, a mistura é centrifugada e a pasta do GO resultante é separada em placas de Petri e postas para secar. O GO seco é usado para produzir um pó a ser disperso em água em concentrações desejadas.

3.3 PREPARO DO BIOSENSOR E INTEGRAÇÃO MICROFLUÍDICA

O biossensor proposto neste trabalho é preparado em 6 etapas. Primeiramente, a fibra decapada e gravada é presa numa barquinha de teflon, assegurando estabilidade durante o contato com os reagentes favorecendo uma deposição uniforme. O suporte de teflon é empregado devido à sua elevada resistência a temperaturas e a tratamentos químicos, permitindo a sua utilização nas soluções de limpeza e funcionalização aplicadas à superfície da LPG (*Long Period Grating*) nas etapas subsequentes. Na Figura 9, vemos a barquinha de teflon branca com resíduos de GO da deposição feita na fibra.

Figura 9 - Foto da LPG revestida com Óxido de Grafeno, preso em uma barquinha de teflon.

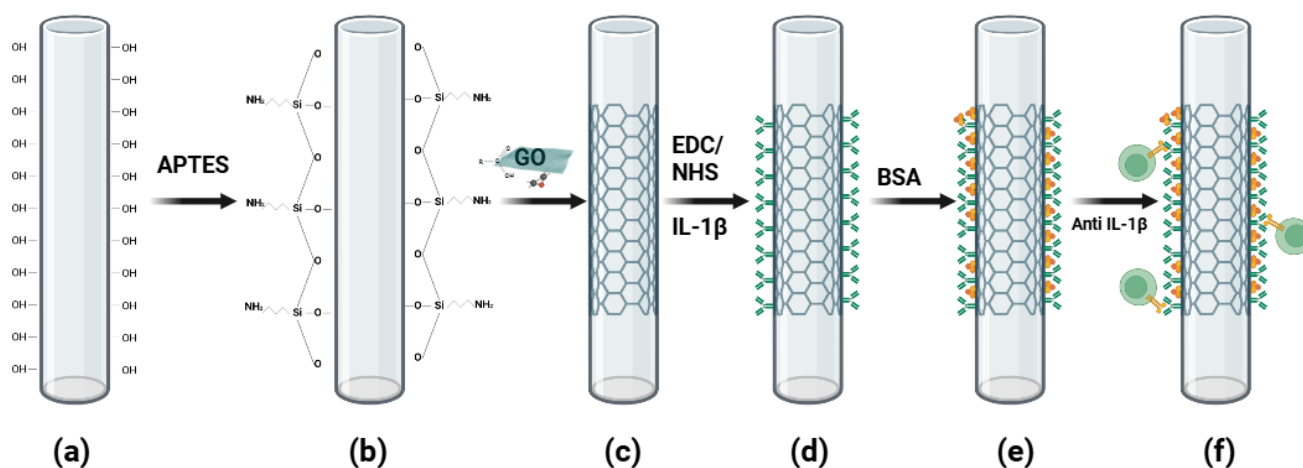


Fonte: O Autor.

Antes da funcionalização com o GO, a LPG é preparada para melhorar a fixação na sua superfície. Inicialmente, é feito um tratamento alcalino com NaOH 1M por 1 hora na porção gravada e decapada da fibra para enriquecer a superfície da sílica com grupos hidroxila ($-OH$)³, como mostrado na Figura 10.a, facilitando reações subsequentes com agentes organossilanos. Esse processo objetiva melhorar a adesão do GO à superfície da LPG. Logo após o tratamento alcalino, a LPG passa por um processo de silanização, onde a fibra é imersa em uma solução de (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) 5% (v/v em etanol) para formar ligações Si-O-Si aos grupos OH formados na primeira etapa, Figura 10.b. Após enxágue com etanol, para a remoção do APTES não ligado, a LPG é imersa em uma solução

de GO a 1 mg/mL por 3 horas. Em seguida, o sensor é levado a temperatura de 40°C até que fique seco, formando uma camada espessa de GO na superfície da fibra Figura 10.c. O Sensor é imerso em uma solução de EDC 20 mM e NHS 40 mM em PBS 0,01 M por uma hora. Em seguida, a fibra foi imersa em uma solução de anti-IL-1 β por duas horas Figura 10.d. Após lavar os anticorpos não ligados com PBS, os sítios ativos restantes na superfície do GO foram bloqueados com uma solução de BSA a 1%, deixando o sensor imerso por 30 minutos, reduzindo ligações inespecíficas, Figura 10.e⁷⁹. Após esta etapa o sensor já está pronto para ser testado com diferentes concentrações de IL-1 β Figura 10.f.

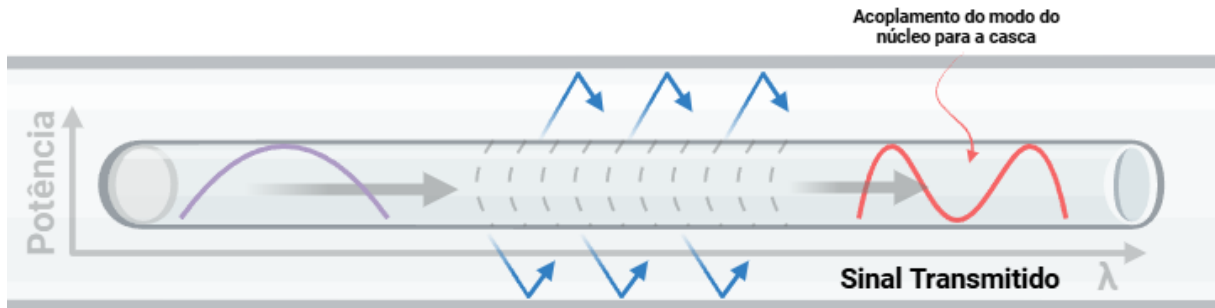
Figura 10 – A esquemática ilustra a produção do biossensor de fibra óptica baseado em LPG revestido com GO: (a) superfície de fibra de sílica LPG com tratamento alcalino; (b) silanização por APTES; (c) deposição de GO; (d) imobilização de IL-1 β via EDC/NHS; (e) passivação de locais disponíveis por solução de bloqueio de BSA; (f) interação de ligação entre o biorreceptor e o analito alvo (anti-IL-1 β).



Fonte: Elaborada pelo Autor. (2025).

A Figura 11 mostra o esquema de funcionamento da LPG na Fibra óptica onde mostra o sinal emitido pela fonte (roxo) e o sinal transmitido após passar pela LPG (vermelho). As setas em azul estão representando a parte do sinal perdida para o ambiente. A partir do comprimento de onda ressonante, é medido o deslocamento causado pelo revestimento com GO, anticorpo e BSA, como sinal de referência para a concentração zero. Após gravar esse sinal de referência, o biossensor está pronto para detectar a ligação entre antígeno e anticorpo em várias concentrações.

Figura 11 - A imagem mostra o funcionamento de uma rede de Bragg em fibra óptica, que reflete um comprimento de onda específico (λ_B) e transmite os demais, atuando como um filtro óptico baseado no período (Λ) das variações do IR.



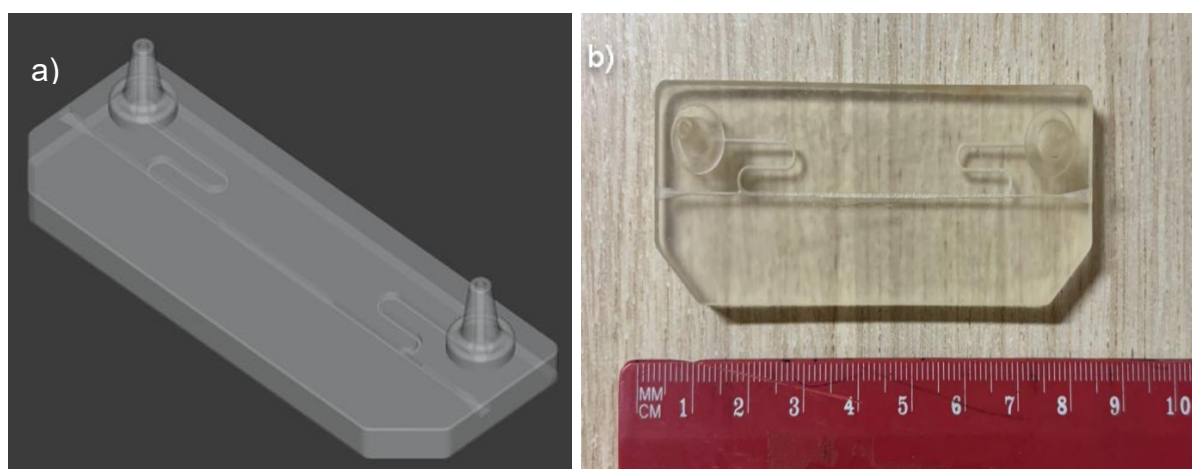
Fonte: Elaborada pelo Autor. (2025).

Em um sensor óptico convencional, o IR é influenciado pela modificação em seu revestimento, formando um guia de ondas de quatro camadas, sendo elas: núcleo, casca, camada de revestimento e meio circundante⁸⁰. A arquitetura de biossensores ópticos adiciona ainda uma quinta camada entre o GO (camada de revestimento de base) e o meio externo, sendo essa quinta camada chamada de camada biofuncional, ou seja, o material que reveste a superfície do GO com moléculas biológicas específicas. Nessa estrutura o analito é detectado em meio aquoso, onde ocorrem as interações moleculares na superfície, causando mudanças no IR^{81,82}. Esse link entre anticorpo-antígeno causa a modificação do IR na casca da fibra, especialmente na camada biofuncional. A mudança no índice de refração e o consequente deslocamento do vale ressonante se deve à soma de alguns efeitos como o aumento de massa pela deposição de antígenos à superfície, o aumento da espessura da camada biofuncional, assim como a mudança na polaridade local decorrente das interações moleculares, que serão discutidos mais a frente⁸³.

Neste trabalho, seguimos as mesmas concentrações de antígenos recombinantes utilizado proposto no protocolo do teste *ELISA*: 0 pg/mL, 31 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL e 500 pg/mL. O anticorpo e antígenos usados foram o human anti-IL-1 β e o human IL-1 β distribuído pela BD biosciences. Na etapa intermediária, após a deposição do GO para proporcionar um ambiente controlado, o sensor foi alojado em uma cápsula microfluídica, para a manipulação de fluidos por meio de microcanais, garantindo um controle preciso e estabilidade durante a detecção. A estrutura possui dois bicos que permitem injetar a amostra

de maneira que não haja vazamento e que passe pela grade do sensor. Os microcanais, por onde percorre toda a amostra, tem diâmetro de 500 μm , garantindo o uso de pequenas quantidades do analito, além da estabilidade do sensor. Os canais garantem que a pressão ocasionada pela injeção da amostra não desloque o sensor. A Figura 12.a apresenta o esquema da barquinha microfluídica para ser impressa, enquanto a Figura 12.b mostra o biossensor encapsulado.

Figura 12 – (a) Design da estrutura microfluídica (b) Biossensor encapsulado em uma barquinha microfluídica.



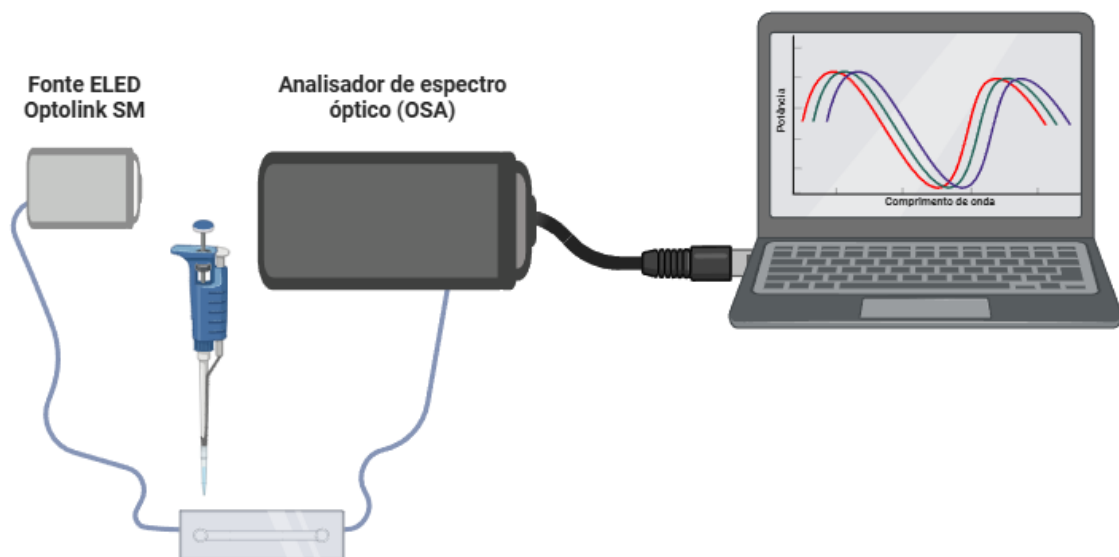
Fonte: Disponibilizado por LiTel.

3.4 CARACTERIZAÇÕES DO BIOSENSOR

3.4.1 Caracterização óptica

O circuito óptico foi configurado em série, partindo da fonte de luz até o biossensor e, em seguida, para o analisador de espectro óptico, conforme ilustrado na Figura 13. A fonte óptica é acoplada ao biossensor encapsulado em uma barquinha microfluídica, onde as soluções são aplicadas com auxílio de uma micropipeta. A radiação transmitida pela fibra é então direcionada ao analisador de espectro óptico, que registra a intensidade em função do comprimento de onda. Os espectros obtidos são exibidos no computador, permitindo observar o deslocamento das bandas de ressonância em resposta às interações na superfície da fibra.

Figura 13 - A imagem apresenta um esquema de medição óptica com fibra. Uma fonte ELED injeta luz na fibra, que passa por um sensor onde uma micropipeta deposita a amostra. O sinal segue para um OSA e é exibido no computador como gráficos espectrais para análise das variações no comprimento de onda.



Fonte: Elaborada pelo Autor. (2025).

A fonte utilizada foi uma fonte ELED Optolink SM com o comprimento de onda central de 1550 nm. Nas medições, o biossensor foi conectado a um analisador de espectro óptico

(OSA), modelo OSA 203 da thorlabs ⁸⁴. O OSA monitora em tempo real as mudanças espectrais à medida que as diferentes concentrações do antígeno são depositadas.

O OSA opera com um interferômetro de Michelson em configuração de varredura a partir de espelhos retrorrefletores movidos por uma bobina que ajusta dinamicamente o caminho óptico. Essa variação gera interferogramas, que ao serem processados, revelam o espectro óptico do sinal.

Os espectros foram tomados em um período de 5 minutos para cada concentração, com registros coletados a cada 1,5 segundo; em outras palavras, para cada concentração acumulamos um total de 200 espectros. Em seguida, os dados foram então processados com um pacote, `process spectra`, do Python, para extrair o comprimento de onda do vale ressonante⁸⁵. Foi aplicado um filtro de Savitzky-Golay com janela de 37 pontos para suavizar cada ponto do espectro, o algoritmo leva em conta 37 pontos vizinhos consecutivos da amostra e polinômio de segunda ordem para redução de ruído⁸⁶; o vale espectral foi identificado; e uma função Lorentziana foi ajustada em torno do pico para localizar com precisão o comprimento de onda ressonante.

3.4.2 Caracterização estrutural e espectroscópica

Neste trabalho foram aplicadas técnicas de caracterização estrutural e espectroscópica fundamentais para compreender as propriedades físico-químicas e morfológicas do biossensor, bem como avaliar os efeitos das etapas de modificação superficial. As análises realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia Raman permitiram investigar, respectivamente, a morfologia e a estrutura química do material, fornecendo informações complementares sobre a deposição das camadas, a integridade da superfície e as alterações induzidas pelos processos de funcionalização.

A MEV é uma técnica amplamente empregada para a caracterizar a estrutura e morfologia de materiais em escala micro. Seu princípio baseia-se na interação de um feixe focalizado de elétrons com a superfície da amostra, gerando diferentes sinais, como elétrons secundários retroespalhados. Esses sinais são coletados e são convertidos em imagens de alta resolução, fornecendo informações a respeito da topografia da amostra. No contexto de biossensores ópticos, o MEV é essencial para avaliar a morfologia da fibra óptica após cada etapa de modificação, permitindo observar a deposição de camadas.

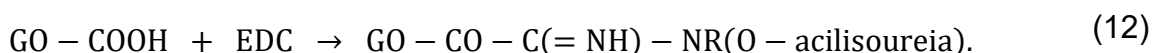
A espectroscopia Raman é uma técnica óptica baseada na interação da luz com modos vibracionais da matéria, sendo amplamente utilizada na caracterização estrutural e química de materiais. Em sistemas à base de carbono, é especialmente importante por permitir a identificação de diferentes formas de hibridização do carbono, defeitos estruturais e grau de desordem. Nessa técnica, um feixe de laser monocromático incide sobre uma amostra. A maior parte da radiação sofre espalhamento elástico, mantendo a energia da luz incidente⁸⁷. No entanto, alguns fótons sofrem espalhamento inelástico decorrente da interação com as vibrações moleculares, provocando uma variação na sua energia. Essa diferença de energia, conhecida como deslocamento Raman, fornece informações específicas sobre os modos vibracionais das moléculas e permite a caracterização de substâncias⁸⁸.

3.5 MECÂNICA DE DETECÇÃO EM BIOSSENSORES ÓPTICOS

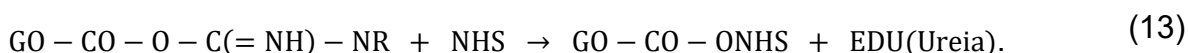
Existem alguns elementos que devem ser discutidos a respeito do funcionamento desses biossensores. Assim, essa seção discute cada elemento do dispositivo, desde funcionamento de uma LPFG como sensor até o tipo de link que acontece entre o GO e os elementos biológicos. Chamaremos de biossensoriamento o mecanismo pelo qual se percebe a variação do IR do biossensor na interface GO + anticorpo/antígeno. Neste processo, a luz evanescente induz uma mudança no sinal óptico alterando a resposta espectral, como será detalhado a seguir.

3.6 BIOAFINIDADE DO ÓXIDO DE GRAFENO

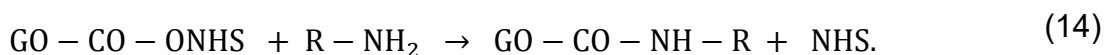
Na etapa final de construção do biossensor, anticorpos IL-1 β (Peprotech, 500-P51) foram imobilizados na superfície de GO utilizando a ligação cruzada EDC/NHS. Inicialmente, o EDC atua sobre os grupos COOH formando, a O-acilisourea, um produto intermediário e instável da ativação da carboxila pelo EDC⁸⁹,



O NHS reage com o intermediário da reação anterior, gerando um éster ativo que estabiliza o sistema para que aumente a chance de formar as ligações desejadas^{32,90},



Esse processo facilita a imobilização das biomoléculas reagindo com os grupos amina (-NH₂) livres gerando uma ligação amida covalente (GO-CO - NH-Anticorpo)³⁵,



Essa técnica garante a orientação correta dos anticorpos preservando os sítios de ligação ao antígeno.

O biossensoriamento (reconhecimento do antígeno pelo anticorpo) baseia-se em interações não covalentes entre as moléculas, tais como interações eletrostáticas, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e força de van der Waals. Essas interações eletrostáticas desempenham um papel fundamental no reconhecimento molecular entre antígeno e

anticorpo, influenciando a especificidade e estabilidade do complexo formado. A distribuição de cargas na superfície do epítopo (a porção do antígeno efetivamente ligada ao anticorpo) e do parátopo (região específica do anticorpo responsável por reconhecer e ligar ao antígeno) gera campos eletrostáticos que podem orientar a aproximação das moléculas e favorecer a complementariedade de cargas. No entanto, o ganho energético consequente dessa complementariedade pode ser parcialmente compensado pela dessolvatação (custo de remoção das moléculas de água) que estabilizam as cargas na superfície proteica. A contribuição líquida dessas das forças eletrostáticas resulta do balanço das atrações coulombianas^{91,92}.

3.7 ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO

É possível entender os mecanismos que envolvem as ligações em termos da energia livre de Gibbs (ΔG), sendo a energia disponível em um sistema para realização de um trabalho. O cálculo da energia livre de um complexo (antígeno e anticorpo ligados) resume-se em somar as contribuições das energias livres do complexo (15). Exploremos as energias livres associadas às interações coulombianas entre as cargas (ΔG_{Coul}), interações pelo processo de perda de camadas de solvente ou dessolvatação (ΔG_{desolv}), as interações de Van der Waals (ΔG_{vdw}) e ligações de hidrogênio (ΔG_{HB}), como meio para compreender a contribuição total da energia livre de ligação⁹³, ou seja:

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{Coul} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{vdw} + \Delta G_{HB}. \quad (15)$$

A equação 16 apresenta a contribuição da energia associada às interações coulombianas entre as cargas do epítopo (q_i) e parátopo (q_j), em função da distância entre eles ($r_{i,j}$), onde ϵ_0 e ϵ são respectivamente a permissividade dielétrica do vácuo e a constante dielétrica do meio. Antes da formação do complexo, as cargas, em geral, permanecem estabilizadas em meio aquoso pelo valor da constante dielétrica da água (ϵ_w)⁹⁴. Ao serem formados os complexos, ocorre uma desestabilização dielétrica do solvente ao redor. Parte do ambiente aquoso é substituído por um meio de constante dielétrica menor (ϵ_p - constante dielétrica da proteína) aumentando a energia eletrostática local. A dessolvatação, associada ao aumento

da energia eletrostática, representa uma barreira energética a ser superada, gerando uma penalidade na energia livre líquida do sistema descrita na (17)^{95,96}. Matematicamente esse modelo, vem de uma aproximação do modelo de Born para energia de solvatação de íons e considera os raios efetivos (a_k) sendo o volume ocupado pelos grupos carregados (q_k), permitindo quantificar as contribuições⁹⁷.

$$\Delta G_{Coul} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{r_{i,j}} \quad (16)$$

$$\Delta G_{desolv} \approx \frac{1}{8\pi\epsilon_0\epsilon} \sum_k q_k^2 \left(\frac{1}{a_k}\right) \left(\frac{1}{\epsilon_p} - \frac{1}{\epsilon_w}\right) \quad (17)$$

Além das interações eletrostáticas, outras contribuições, já mencionadas, podem auxiliar na estabilidade das biomoléculas⁹⁸. As interações por van der Waals surgem de flutuações temporárias de dipolos induzidos, proporcionando atrações de curto alcance que auxiliam no ajuste entre as superfícies do parátipo e do epítipo. Essas interações permitem que as pequenas áreas de contato participem da estabilidade do complexo. Junto a isso, as pontes de hidrogênio, formadas entre grupos doadores e aceitadores de hidrogênio, promovem um alinhamento específico entre antígeno e anticorpo, reforçando a afinidade e a seletividade do reconhecimento molecular⁹⁸.

A equação 18 apresenta a contribuição da energia associada às interações de Van der Waals modelada pelo potencial de Lennard-Jones, descrevendo a interação parátipo-epítipo⁹⁹, como é mostrada a seguir:

$$\Delta G_{vdw} = \sum_{i<j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^6 \right]. \quad (18)$$

Essa interação é descrita em termos de atração (σ_{ij}^6/r_{ij}^6) que fixa as partes quando estão em uma distância ótima e repulsão ($\sigma_{ij}^{12}/r_{ij}^{12}$) que age rapidamente quando essa distância é reduzida¹⁰⁰. Enquanto as ligações de hidrogênio formadas entre o par parátipo-epítipo, representadas pela equação

$$\Delta G_{HB} = -E_0 \cdot e^{-\alpha(r_{ij}-r_0)} \cdot [\cos(\theta_{ij} - \pi)], \quad (19)$$

são modeladas considerando a energia de estabilização (E_0) e a geometria da interação, ou seja, a distância e o ângulo formado entre as biomoléculas^{101,102}. A contribuição radial

$(e^{-\alpha(r_{ij}-r_0)})$ controla o quanto a força de ligação reduz quando as biomoléculas se afastam, enquanto o termo angular $(\cos(\theta_{ij} - \pi))$ regula a força das ligações em relação ao ângulo formado entre parátopo, a molécula de hidrogênio (H) e o epítopo^{103,104}.

A contribuição eletrostática em sistemas de reconhecimento molecular, como reconhecimento antígeno-anticorpo, relaciona-se diretamente com a presença de cargas elétricas na superfície das moléculas. A presença de grupos químicos ionizáveis, como carboxilas e amina, contribui para o sistema como uma nova distribuição de cargas elétricas. Essa nova distribuição de cargas gera campos elétricos e altera o potencial eletrostático global influenciando a energia livre de ligação. As demais interações não covalentes contribuem complementando para o reconhecimento, seletividade, orientação e estabilidade molecular. Em suma, essas contribuições moldam individualmente o perfil da energia livre de ligação, determinando estabilidade do complexo formado. Esses mecanismos descritos acima determinam a energia livre para as ligações que ocorrem na camada bioativa do sensor, sendo essas interações o que determina as mudanças no IR do revestimento da fibra.

3.8 LONG PERIOD GRATING COMO SENSOR

Já discutimos antes que ao fazer atravessar um feixe de luz pela LPG, uma parte do sinal, quando passa pela grade, é transmitido para casca e como a luz geralmente não pode se propagar na casca, ela é atenuada e rapidamente perdida para o ambiente⁷¹. Como os modos se atenuam ao longo da fibra, eles interagem com o ambiente externo, fazendo o sensor apresentar alta sensibilidade às mudanças no IR. Dessa forma, o uso da LPG como sensor se dá pela variação do IR na região ativa do biossensor que afeta a posição do comprimento de onda ressonante, como mostra a equação:

$$\lambda_{res} = (\Delta n_{eff} + \Delta n_{eo} + \Delta n_{fe}) \cdot \Lambda. \quad (2020)$$

Essa variação do IR pode acontecer por diferentes mecanismos como o efeito eletro-óptico (Δn_{eo}) e o efeito fotoelástico (Δn_{fe}). Cada um desses efeitos contribui para o deslocamento do vale ressonante sendo descrito a seguir.

$$\Delta \lambda_{res} = \Lambda \cdot (\Delta n_{eo} + \Delta n_{fe}) \quad (2121)$$

O efeito eletro-óptico altera o IR do meio devido a alteração no campo elétrico externo¹⁰⁵. Quando a IL-1 β se liga ao anti-IL-1 β a mudança da distribuição de cargas elétricas na superfície é responsável por alterar o campo elétrico do revestimento do sensor (GO - anticorpo/antígeno). Esse efeito gera uma alteração na estrutura eletrônica da fibra, ocasionando uma mudança na velocidade de propagação da luz e por consequência no IR na região sensível do sensor¹⁰⁶. A equação (2222) apresenta a variação do IR pelo efeito eletro-óptico, onde n é o IR do material, r é o coeficiente eletro-óptico e E é o componente de campo elétrico¹⁰⁷. Embora a fibra óptica seja imune aos efeitos diretos de carga elétrica, a redistribuição de cargas elétricas associada aos biomarcadores ligados influencia o filme de GO e demais camadas adjacentes, mudando a resposta óptica do revestimento do sensor^{108,109}.

$$\Delta n_{eo} = -\frac{n^3 r E}{2} \quad (2222)$$

Em interações eletrostáticas, grupos carregados negativamente no antígeno atraem os grupos positivamente carregados no anticorpo. A citocina IL-1 β é uma proteína que, como as demais, possui em sua estrutura aminoácidos com cadeias laterais carregadas. O equilíbrio entre as cargas determina a carga líquida da molécula, descrita pelo seu ponto isoelétrico (pI). O ponto isoelétrico define a carga líquida de uma cadeia proteica e corresponde ao valor de pH no qual a molécula apresenta carga líquida nula. Dessa forma, em valores de pH abaixo do pI, a proteína tende a apresentar carga positiva devido à protonação dos grupos ionizáveis. Já em valores de pH acima do pI, a proteína passa a ter carga negativa, em função da desprotonação desses grupos¹¹⁰. No caso da IL-1 β diluído em PBS, a solução apresenta o $pH \approx 7,4$ e o pI situa-se próximo de 6,9 o que indica que a proteína apresenta carga líquida levemente negativa¹¹¹. Essa relação apresenta, no geral, um aumento na densidade eletrônica do revestimento, gerando uma contribuição positiva em Δn_{eo} deslocando o vale ressonante (equação 21) para comprimentos de onda maiores (redshift).

O efeito fotoelástico é a variação do IR do devido a efeitos mecânicos¹¹². Quando as moléculas se ligam ao biossensor, mudam a massa superficial que causam micro deformações mecânicas no revestimento sensor. Quando o sensor é submetido a deformações no revestimento, apresenta IRs diferentes dependendo da direção de

polarização da luz¹¹³. Isso ocorre devido à modificação na estrutura molecular do material causado pela deformação alterando a velocidade de propagação da luz em cada direção. A equação 23 apresenta a variação do IR pelo efeito fotoelástico (Δn_{fe}), onde p é o coeficiente fotoelástico do material e ε é o coeficiente de deformação mecânica. As micro deformações causadas pela adição de massa no revestimento do sensor levam a mudanças no coeficiente de deformação mecânica¹¹⁴. Na equação (23) é possível notar facilmente a contribuição negativa do Δn_{fe} deslocando o vale ressonante (equação 21) para comprimentos de onda menores (blueshift)

$$\Delta n_{fe} = -\frac{n^3 p \varepsilon}{2}. \quad (23)$$

A troca de carga resultante da ligação antígeno-anticorpo modifica o ambiente dielétrico ao redor da fibra e a massa na camada de revestimento, impactando na posição do vale ressonante. O GO nessa estrutura atua como amplificador dessa resposta óptica devido à sua alta área superficial, densidade de grupos funcionais e capacidade de concentrar cargas elétricas transmitindo esses efeitos para os modos de propagação da casca e alterando as condições iniciais do espectro de referência (GO-Anticorpo-BSA)¹¹⁵.

3.9 EQUAÇÃO DE CRESCIMENTO LOGÍSTICO

A aplicação de um modelo matemático que representa um fenômeno biológico oferece uma descritiva e preditiva, ao permitir a análise de sistemas vivos e a formulação de hipóteses testáveis. Essa modelagem quantitativa torna-se ainda mais robusta e especialmente útil em contextos de resposta biológica, quando integrada ao cálculo de sensibilidade e do LOD. O modelo de crescimento logístico, representado pela equação (2424), permite delimitar a sensibilidade mínima para um fenômeno ser medido¹¹⁶. Nessa equação, λ_{max} é o valor mais alto de comprimento de onda, λ_{min} é o valor mais baixo de comprimento de onda, C concentração do analito, C_0 é a concentração característica e p é o coeficiente de cooperatividade, modelado pela interação entre os indivíduos e controla a inclinação da curva. O coeficiente de cooperatividade ajusta a forma da curva de

crescimento, indicando se os indivíduos da população crescem de forma independente ($p = 1$), de modo cooperativo ($p > 1$) ou se competem entre si ($p < 1$). Em termos físicos, ele representa como as interações entre os indivíduos influenciam a taxa de crescimento da curva¹¹⁷. As curvas modeladas por essa equação geralmente apresentam crescimento inicial acelerado, seguido de uma desaceleração e, por fim, de um platô de estabilização. No contexto deste trabalho, o modelo foi aplicado com o objetivo de descrever o comportamento das ligações que ocorrem na construção do biossensor (GO-Anticorpo e GO-BSA) ou na etapa de testes (Anticorpo-Antígeno) que serão descritos na próxima sessão

$$\lambda(C) = \lambda_{min} + \frac{\lambda_{max} - \lambda_{min}}{1 + \left(\frac{C}{C_0}\right)^p}. \quad (2424)$$

Esse tipo de modelagem permite averiguar a adequação do experimento por meio do coeficiente de determinação (equação 25(2525)) onde $\hat{\lambda}_i$ são os valores preditos pelo modelo logístico, $\bar{\lambda}$ é a média dos valores observados e λ_i são os valores medidos de comprimento de onda. Esse coeficiente serve como um indicativo da capacidade do modelo de descrever a relação entre as variáveis em sistemas biológicos. Os valores próximos de 1 indicam que o modelo representa bem os dados observados, sugerindo uma correlação consistente entre as variáveis analisadas. Em sistemas biológicos onde existe variabilidade, a confiabilidade do modelo é reforçada por esse tipo de análise

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\lambda_i - \hat{\lambda}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (\lambda_i - \bar{\lambda})^2}. \quad (2525)$$

Dessa forma a sensibilidade do biossensor é definida como a taxa de variação da resposta em relação à concentração do analito, podendo ser determinada pela derivada da função logística no ponto de inflexão C_0 (equação (2626)). Nesse ponto, a curva apresenta sua maior inclinação, o que corresponde à máxima capacidade do sensor em detectar pequenas variações na concentração¹¹⁸

$$S = \left(\frac{d\lambda(C)}{dC}\right)_{C=C_0} = \frac{(\lambda_{max} - \lambda_{min}) \cdot p}{4 \cdot C_0}. \quad (2626)$$

Utilizando a sensibilidade, pode-se calcular o LOD (equação (2727), conforme amplamente descrito na literatura, sendo três vezes o desvio padrão da menor medida dividido pela sensibilidade^{58,119}. Após o tratamento, os dados foram ajustados conforme a equação de crescimento logístico, considerada mais adequada para descrever o comportamento em sistemas biológicos

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma_{min}}{S}. \quad (2727)$$

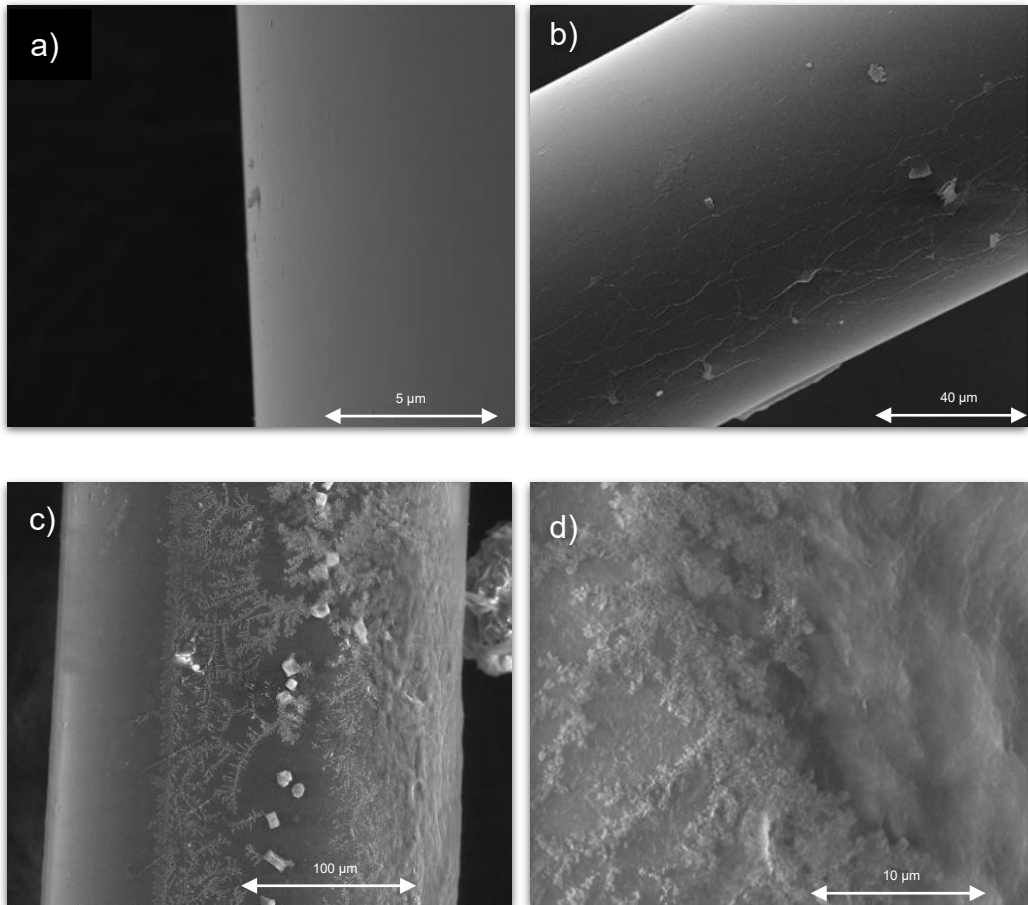
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi empregada para caracterizar a morfologia da superfície do revestimento da LPG e confirmar a adesão do GO, bem como a subsequente conjugação das biomoléculas à superfície da fibra. As imagens apresentadas na Figura 14, foram utilizadas para comparar a superfície do sensor LPG em cada etapa de revestimento. A imagem da Figura 14.a apresenta a superfície da fibra óptica antes do revestimento ser adicionado mostrando apenas a superfície vítrea e lisa da parte decapada da fibra onde foi gravado a LPG. A Figura 14.b mostra a morfologia da superfície da fibra após o revestimento com GO, evidenciando uma superfície de estrutura lamelar, com aparência rugosa e irregular. Em contraste, a Figura 14.c revela a presença de estruturas granulares e aglomerados após a conjugação com biomoléculas, sugerindo a adsorção e fixação efetiva dos compostos proteicos, como a IL-1 β e o BSA. Essas alterações morfológicas visíveis confirmam a ocorrência de modificações estruturais na superfície atribuídas à interação entre o GO e as biomoléculas depositadas. A Figura 14.d, com aumento de 10000 vezes, destaca em maior detalhe a textura e a rugosidade resultantes da biofuncionalização mostrando uma superfície amorfa com algumas granulações locais.

Figura 14 – (a) MEV do sensor de LPG sem revestimento (b) MEV do sensor de LPG revestido com GO (c) Imagem de MEV do sensor após a conjugação com biomoléculas (d) Imagem com aumento de 10000x da superfície do biossensor.



Fonte: O Autor.

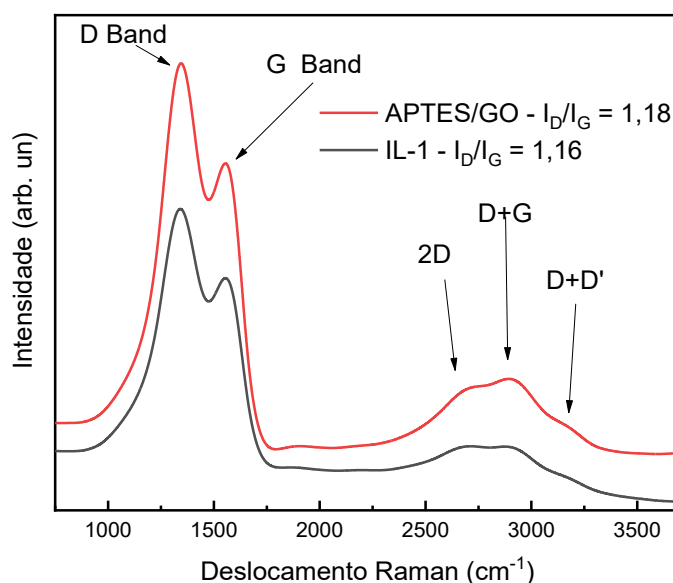
4.1.2 Espectroscopia Raman

Como mencionado anteriormente, a espectroscopia Raman é amplamente utilizada para a caracterização química e estrutural de materiais. Em particular, apresenta elevada sensibilidade às vibrações da ligação C–C, o que a torna especialmente adequada para o estudo de materiais à base de carbono, como o GO¹²⁰. Esses materiais exibem espectros característicos compostos principalmente por três bandas: a banda D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$), associada a defeitos estruturais e desordem na rede de carbono; a banda G ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$), correspondente ao modo vibracional dos átomos de carbono com hibridização sp^2 ; e a banda 2D ($\sim 2700\text{ cm}^{-1}$), resultante de um processo de segunda ordem envolvendo dois fônons da

banda D¹²¹. A análise dessas bandas permite avaliar a ordem estrutural, a densidade de defeitos e o grau de empilhamento das camadas gráficas. Além disso, podemos usar a razão da intensidade relativa entre as bandas D e G, conhecida como $\left(\frac{I_D}{I_G}\right)$ como um indicador do grau de desordem estrutural das amostras¹²².

O espectro Raman do dispositivo foi analisado em duas etapas de funcionalização da fibra. Na primeira etapa com a deposição de APTES/GO e na segunda, após a conjugação com IL-1 β . A Figura 15 apresenta o espectro Raman típico do GO, no qual se observam claramente as bandas características D (~1345 cm⁻¹), G (~1555 cm⁻¹), 2D (~2690 cm⁻¹), D+G (~2895 cm⁻¹) e D+D' (~3160 cm⁻¹). A presença simultânea das bandas D e G confirma a natureza gráfica oxidada do material. As bandas 2D, D+G e D+D', de segunda ordem, resultam de processos de dispersão envolvendo múltiplos fônons e fornecem informações adicionais sobre o empilhamento e a integridade estrutural das camadas gráficas. A posição e baixa intensidade da banda 2D indica que o GO utilizado neste trabalho apresenta poucas camadas, evidenciando que os métodos de Hummers modificados foram eficazes em promover um alto grau de oxidação e esfoliação do material^{123–125}.

Figura 15 - Espectros Raman do GO rico em carbonila e do biossensor. Todos os espectros foram medidos à temperatura ambiente usando um laser de 532 nm com potência de 5 mW.



4.2 RESULTADOS DO SENSOR

4.2.1 Análise da construção do sensor

Neste tópico será explorado o comportamento do sensor durante a deposição da camada biofuncional. Durante a construção do biossensor foram monitoradas as etapas de incubação do anti-IL-1 β sobre a estrutura do GO utilizando a ligação cruzada EDC/NHS e incubação no BSA que, como já foi dito, tem por finalidade bloquear todos os sítios ativos do GO que não foram ocupados com anti-IL-1 β . Como descrito na seção experimental, os anticorpos e antígenos usados foram o human anti-IL-1 β e o human IL-1 β distribuído pela BD biosciences. Nesta etapa de deposição do anti-IL-1 β e do BSA, o sensor foi alojado em uma cápsula microfluídica (Figura 12), para a manipulação de fluidos por meio de microcanais, garantindo um controle preciso e estabilidade durante o monitoramento do vale ressonante. No entanto, é preciso ressaltar que a concentração do anti-IL-1 β não é conhecida. Foi feito contato com o fornecedor, mas a empresa responsável pelos testes *ELISA* mantém essa informação em sigilo. Outro ponto importante de ser registrado é que para poder comparar nossos resultados com os resultados do kit padrão feito para o teste *ELISA*, seguimos os mesmos protocolos de tempo para a ancoragem do anticorpo no biossensor previsto no teste adquiridos. Com isso, podemos comparar a sensibilidade do nosso sensor com a sensibilidade típica prevista para o teste *ELISA*. No mercado existem vários Kits para esses testes e a depender do Kit o tempo de ancoragem do anticorpo pode variar de 1h a 2h. Neste trabalho, usamos a janela de 1 hora e 40 minutos na etapa de incubação com o anticorpo (anti-IL-1 β) conforme instrução do fornecedor do kit adquirido.

Como discutido nas seções 3.7 e 3.8, a mudança no índice de refração e o consequente deslocamento do vale ressonante se deve à soma de alguns efeitos. Vimos que alguns dos principais efeitos tem como origem o aumento de massa pela deposição de material à superfície da fibra, o aumento e da espessura da camada biofuncional, assim como a mudança no campo local decorrente das interações moleculares.

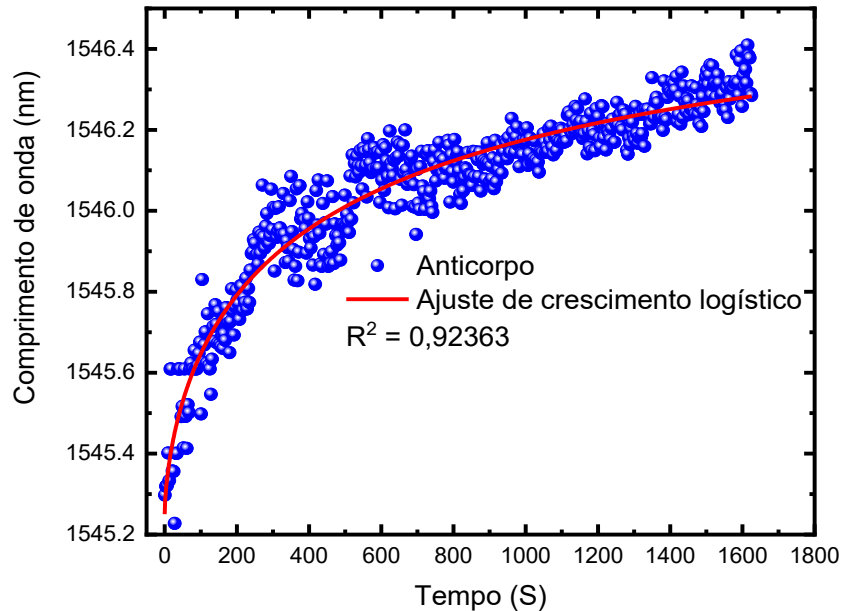
A Figura 16 mostra o gráfico de deslocamento espectral do vale ressonante em função do tempo de ancoragem do anti-IL-1 β . Esse gráfico apresenta, em azul, a posição do vale ressonante registrado a cada 1,5 segundos. Nessa fase, observa-se um deslocamento de aproximadamente 1,5 nm como resultado da imobilização do anti-IL-1 β ao GO. A curva em vermelho representa o ajuste de crescimento logístico⁵⁸, onde pode-se notar uma boa

adequação ao modelo, representado pelo coeficiente de determinação (R^2) próximo de 1. Como discutido na sessão 3.9, o ajuste de crescimento logístico é um modelo descritivo que busca representar um fenômeno biológico. A boa concordância entre o modelo e os resultados experimentais indicam que as variáveis da equação são representadas de forma satisfatória pelos dados extraídos.

De acordo com a equação 22, discutida anteriormente, a variação do IR pelo efeito eletro-óptico (Δn_{eo}), dado pela redistribuição de cargas elétricas associada aos biomarcadores ligados influencia o filme de GO e demais camadas adjacentes, mudando a resposta óptica do revestimento do sensor^{108,109,126}. Essa relação apresenta, no geral, um aumento na densidade eletrônica do revestimento, gerando uma contribuição positiva em Δn_{eo} , deslocando o vale ressonante (equação 21) para comprimentos de onda maiores. Logo, analisando o gráfico da Figura 16, concluímos que durante essa janela de tempo analisada, a contribuição na mudança do IR se dá predominantemente pelo efeito eletro-óptico (Δn_{eo}) devido à nova distribuição de cargas e conseqüentemente nova redistribuição de campos elétricos, que altera o potencial eletrostático global influenciando na energia livre de ligação.

Também vimos que quando o sensor é submetido a deformações no revestimento, ele apresenta IRs diferentes dependendo da direção de polarização da luz¹¹³. Isso ocorre devido à modificação na estrutura molecular do material causado pela deformação na superfície do revestimento do biossensor devido a adição de massa molecular. Essa deformação tende a alterar a velocidade de propagação da luz em cada direção. A equação 23 apresenta a variação do IR pelo efeito fotoelástico (Δn_{fe}). Na equação 23 é possível notar a contribuição negativa do Δn_{fe} no deslocando o vale ressonante (equação 21) para comprimentos de onda menores (blueshift). Observando a Figura 16, nota-se que, ao longo do tempo, conforme mais ligações ocorrem, há uma tendência de estabilização da curva. Essa estabilização está relacionada à disponibilidade limitada de sítios de ligação, bem como à adição de massa na superfície do sensor, que contribui para o aumento de Δn_{fe} .

Figura 16 - Gráfico de comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no anti-IL-1 β , mostrando deslocamento do vale ressonante para comprimentos de onda maiores.

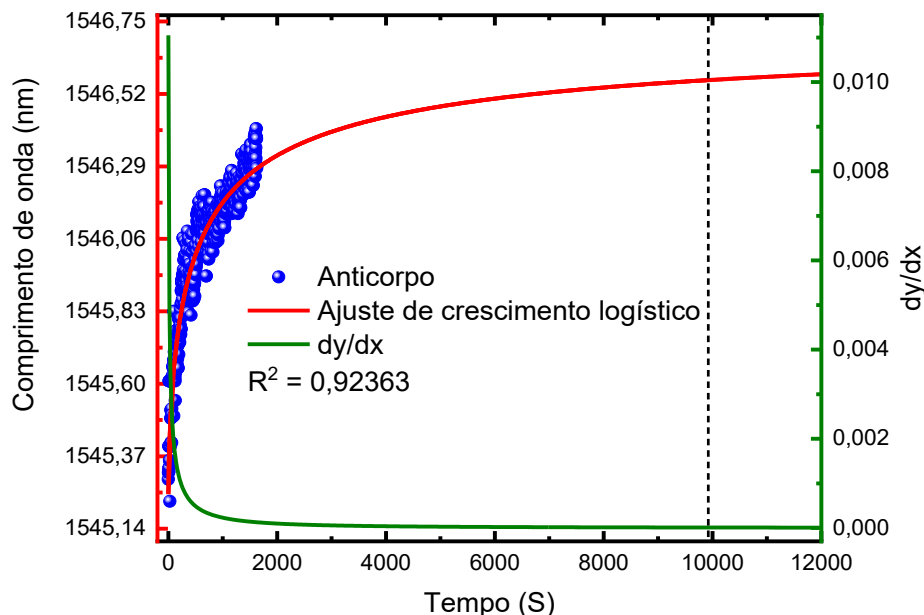


A

Figura 17 mostra uma extrapolação do ajuste de crescimento logístico para tempos superiores ao tempo de 1 hora e 40 minutos indicado para kit *ELISA*. Ao aplicar uma derivada numérica aproximada (dY/dX) usando os próprios pontos da curva, observa-se que, de acordo com o modelo logístico os sítios livres do GO seriam totalmente preenchidos após aproximadamente 2 horas e 47 minutos (≈ 10000 segundos). A partir desse ponto, os valores de comprimento de onda variam de 1546,57 nm para 1546,70 nm ao longo de dezenas de milhares de pontos, o que é insignificante perto da escala inicial. Esse valor poderia ser alterado caso adotemos uma tolerância mais ou menos rigorosa. Caso consideremos pequenas variações, algo próximo de 0,13 nm ($\approx 1546,57$ nm para 1546,70 nm) como “constante”, o platô pode ser considerado próximo de 1 hora de incubação. No entanto, a análise mais relevante talvez esteja nesse intervalo, mostrando que ainda existe a tendência (curva extrapolada) de deslocamento do vale ressonante para maiores comprimentos de onda. Isso indica que a massa de anticorpos depositada não afeta mecanicamente o suficiente o sistema para superar as interações eletrostáticas, causando assim, uma variação do IR pelo efeito eletro-óptico mais intensa que pelo efeito fotoelástico¹¹².

Como dito acima, foi seguido rigorosamente o protocolo do kit *ELISA*. Devido ao custo desses kits e a quantidade disponível, não foi possível realizar mais experimentos para verificar se a concentração de anticorpos vendida no kit seria suficiente para seguir ancorando ao GO seguindo a linha extrapolada do crescimento logístico. Porém pela tabela de dados reais, os anticorpos atingem o máximo valor de 1546,29 nm, embora se considerarmos o valor do platô da curva logística como o máximo valor de deslocamento que poderíamos obter se deixássemos o líquido do kit agindo por 2 h e 47 min, o deslocamento chegaria em 1546,57 nm. Ou seja, podemos concluir que em 1 h e 40min a reação aconteceu quase que completamente, uma diferença de apenas 0,018% para a máxima incubação teórica prevista pela curva extrapolada de crescimento logístico.

Figura 17 - Gráfico de extrapolação de ajuste de crescimento logístico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no anti-IL-1 β indicando a tendência de estabilização das interações na construção do biossensor.

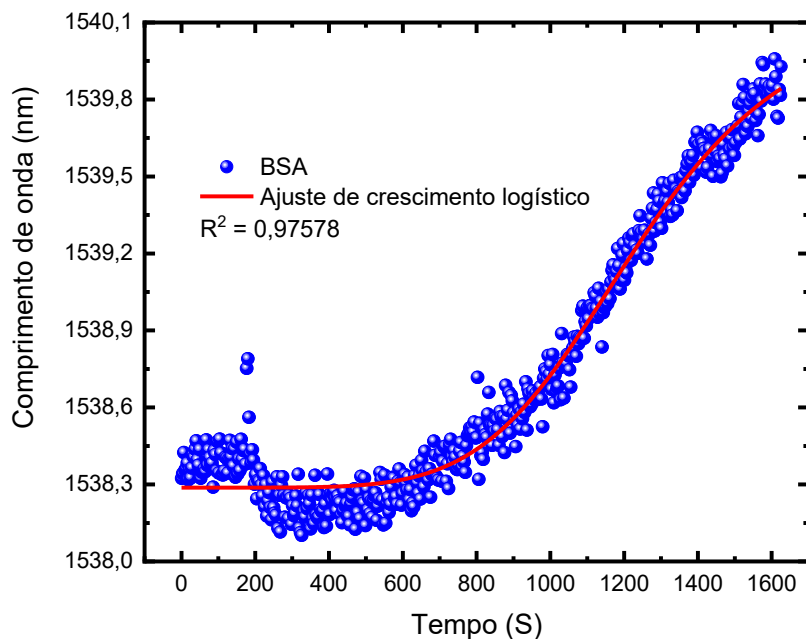


O BSA seguiu o mesmo protocolo previsto para o teste *ELISA* para o bloqueio dos sítios ativos do GO. Para isso, preparou-se uma solução de 1% de BSA em PBS (0,01g/ml). Antes de cada etapa do preparo da camada biofuncional, assim como da etapa de testes, é

realizada uma limpeza três vezes com um fluxo de PBS. Esse processo é feito para retirar as moléculas não ligadas.

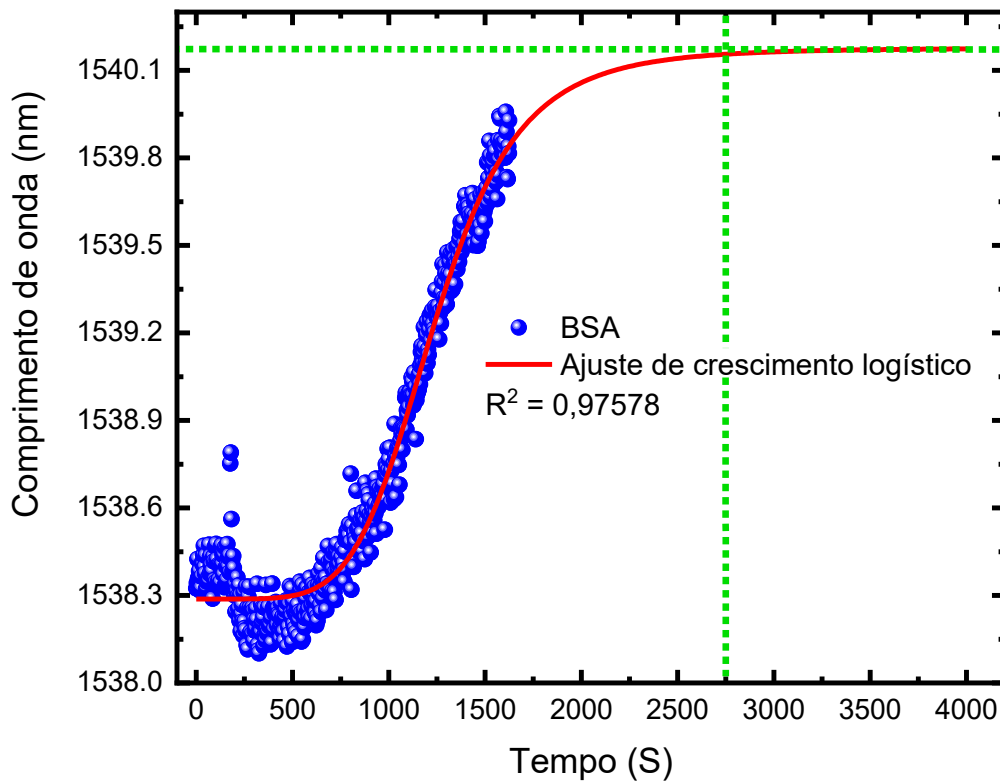
Na Figura 18, observa-se o deslocamento do vale ressonante em função do tempo, obtido durante a incubação com o BSA. Essa etapa não apresenta nenhum deslocamento significativo nos primeiros 400 segundos. Isso pode estar relacionado a uma cinética de ligação intrinsecamente mais lenta do BSA com os sítios ainda livres do GO, e/ou ao fato de que muitos dos sítios ativos do GO já estão ligados com o anticorpo. Mesmo assim, é possível ver que ao final de um mesmo período de 1600 segundos do protocolo seguido, o deslocamento do vale ressonante foi um pouco mais intenso, de aproximadamente de 1,86 nm se comparado com a variação promovida pela ligação dos anticorpos. Aqui novamente, concluímos que durante essa janela de tempo analisada, a contribuição na mudança do IR é regida pelo efeito eletro-óptico (Δn_{eo}) devido à nova distribuição cargas das ligações químicas do BSA que consequentemente alteram o potencial eletrostático global influenciando na energia livre de ligação. Da mesma forma, não é possível identificar nenhuma alteração mecânica suficiente no sistema para causar uma variação do IR pelo efeito fotoelástico^{127,128}.

Figura 18 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no BSA indicando o deslocamento do vale ressonante para comprimentos de onda maiores.



Fazendo novamente a extrapolação da curva de crescimento logístico (Figura 19), vemos que seria desejável deixar um tempo ligeiramente maior (até aproximadamente 2500 s) para garantir saturação dos sítios do GO. Novamente o tempo aqui neste teste foi interrompido para se manter coerência com os protocolos comerciais.

Figura 19 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para a incubação no BSA indicando a tendência de estabilização das interações na construção do biossensor.



Após o bloqueio dos sítios ativos do biossensor com BSA, o sistema encontra-se preparado para a etapa de detecção da citocina IL-1 β . O bloqueio é uma etapa essencial, pois evita que proteínas ou biomoléculas não específicas se adsorvam diretamente sobre a superfície do GO, reduzindo ruídos de fundo e garantindo maior seletividade na detecção. Durante a etapa de detecção, a interação IL-1 β – anti-IL-1 β ocorre predominantemente por interações eletrostáticas e de reconhecimento molecular. Essas interações promovem o aumento de massa, alteração mecânica da camada biofuncional e alteração na densidade de cargas, que altera o índice de refração efetivo (Δn_{ef}) da camada sensora, resultando em um deslocamento do vale ressonante para comprimentos de onda maiores ou menores, como resultado da prevalência de um ou outro efeito, conforme discutido anteriormente.

4.2.2 Análise das ligações específicas dos antígenos ao biossensor em operação

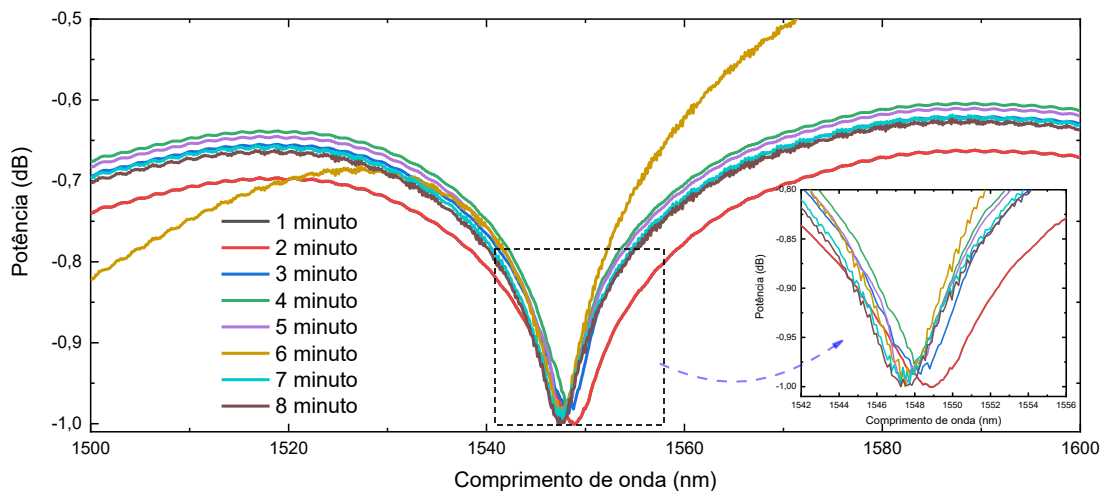
Essa seção vai explorar os resultados de operação do biossensor, comparando cada um dos diferentes pontos de concentração do analito. Os testes de funcionamento do sensor foram realizados incubando-o em diferentes concentrações do analito. Foram testados cinco pontos consecutivos para as seguintes concentrações de IL-1 β de 31,3, 62,5, 125, 250 e 500 pg/mL, concentrações essas retiradas do protocolo usado para o teste *ELISA*. Porém, antes de iniciar os testes nessas concentrações, foi preciso determinar qual a janela de tempo deixaríamos para a ligação entre antígeno e anticorpo. Esse tempo foi determinado com base no seguinte experimento: monitoramos a variação do comprimento de onda ressonante ao longo do tempo, após a exposição do biossensor a 500 pg/mL do analito IL-1 β , Figura 20. Escolhemos a maior concentração justamente porque essa será a última e a maior concentração testada. Isso nos permitiu manter o sensor incubado em um intervalo de tempo maior para garantir que, nesse período, mais antígenos se liguem aos anticorpos. Ou seja, ao esperar um tempo suficientemente grande para saturar as ligações antígeno-anticorpo para a maior concentração, esse mesmo tempo será mais que suficiente para garantir essas ligações quando em concentrações menores. Além disso, usando neste teste a maior concentração, também foi possível determinar de antemão qual o maior deslocamento do vale ressonante dentre todas as concentrações. Após cada etapa é realizada uma lavagem com PBS, para garantir a remoção das biomoléculas não ligadas, e em seguida incubado a concentração seguinte.

Assim, para esse primeiro teste (Figura 20), foi feito o monitoramento contínuo do vale ressonante até determinar o tempo necessário para a resposta espectral estabilizar, indicando o fim da fase de interação entre o antígeno e os anticorpos previamente imobilizados. Observamos neste teste que logo nos primeiros minutos de incubação⁵², ocorre uma mudança acentuada no comprimento de onda ressonante, indicando uma rápida interação de afinidade entre as biomoléculas (anticorpo–antígeno). Esse comportamento caracteriza um sistema responsivo e adequado para aplicações em monitoramentos, em que respostas rápidas são desejáveis. O Gráfico de potência em função do comprimento de onda apresenta 8 curvas características desse sensor. Cada uma dessas curvas refere-se a um instante de incubação do dispositivo no IL-1 β . Nota-se nesse teste que existe uma variação da posição do vale ressonante, indicando a operação do sensor. No inset da Figura 20, observa-se de forma mais clara a mudança do vale ao longo do tempo, entre o primeiro

minuto, curva preta para os minutos seguintes, curvas coloridas. Observamos um deslocamento quase contínuo do vale para comprimentos de onda menores. Nota-se que a curva referente ao minuto 2 (curva vermelha) está ainda praticamente sobre a curva do minuto zero (preta) mostrando uma latência para o início das reações. No entanto, observado o comportamento das curvas seguintes, vemos que após 5 min o vale ressonante parou de variar, indicando o fim das reações antígeno-anticorpo. Esse será então o tempo máximo que será usado para todas as concentrações mencionadas acima. Esse experimento foi realizado com o intuito de se determinar a janela máxima necessária para as reações de ligação entre antígeno-anticorpo.

Conforme já discutimos antes, a contribuição negativa do efeito fotoelástico (Δn_{fe}) desloca o vale ressonante (equação 21) para comprimentos de onda menores. Isso é justamente o que acontece neste caso para essa massa de 500 pg/mL, indicando que após o término de ligação dos antígenos nessa concentração, a componente fotoelástica é dominante ao final do processo.

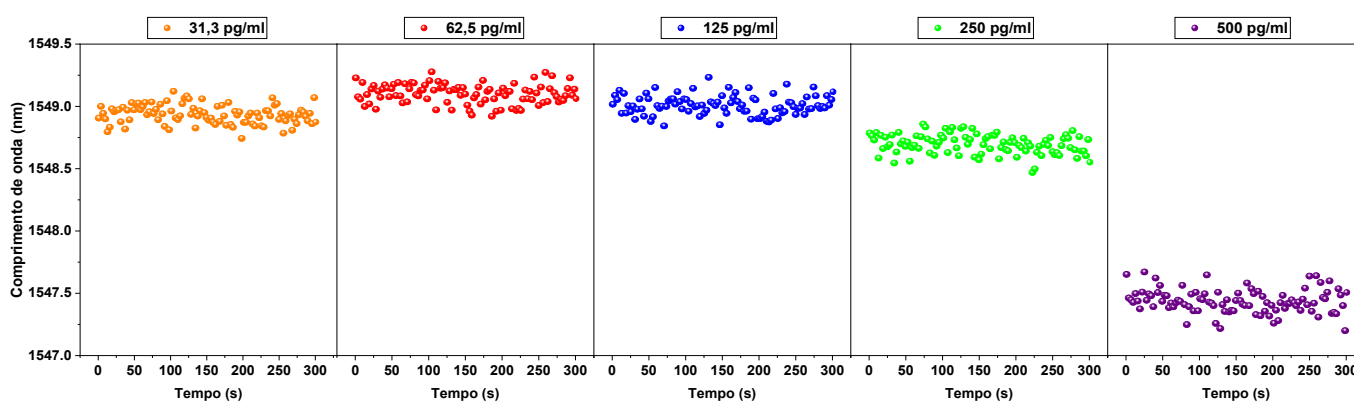
Figura 20 – Gráfico de potência em função do comprimento de onda para incubação de 500 pg/mL do antígeno ao longo de 8 minutos.



A Figura 21 mostra a posição dos vales ressonantes em relação ao comprimento de onda para cada concentração testada. É possível notar facilmente que para as três concentrações mais baixas (31,3, 62,5, 125 pg/mL), o biossensor realiza a detecção, ou seja, há uma

mudança no IR, que conseqüentemente leva a uma mudança na posição do vale ressonante com relação ao vale de referência (fibra com apenas GO/Anticorpo/BSA). Entretanto, não é possível diferenciar significativamente a variação na posição entre essas três primeiras concentrações. Para as concentrações seguintes vê-se deslocamentos maiores para comprimentos de onda menores. No entanto, a diferença entre as intensidades de deslocamento medidas do IL-1 β neste primeiro teste demonstrou a eficiência da funcionalização e da seletividade do sensor para as ligações específicas (anti-IL-1 β - IL-1 β).

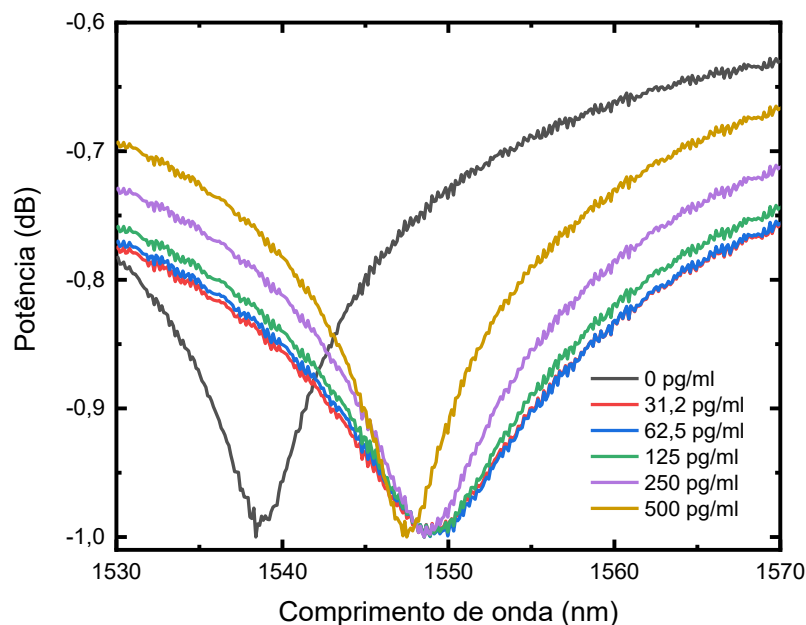
Figura 21 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para as diferentes concentrações do anti-IL-1 β , durante o processo de interação ligante.



A Figura 22 apresenta um gráfico médio dos pontos coletados durante a janela de 5 min, que mostra a variação da potência em função do comprimento de onda dos espectros de transmissão do biossensor para as diferentes concentrações de IL-1 β . A curva preta, cujo vale ressonante está centrado em 1538,40 nm, é nossa referência (GO/Anticorpo/BSA) e está identificada como ponto zero, ou seja, indica a posição do vale imediatamente antes de se injetar o fluido com a primeira concentração de antígeno na câmara microfluídica. As curvas coloridas mostram o deslocamento da posição do vale ressonante devido a ligação entre anti-IL-1 β e IL-1 β para as várias concentrações utilizadas neste estudo. Para as três primeiras concentrações, observamos o deslocamento do vale ressonante para comprimentos de onda mais altos, em torno de 1548,00 nm. Esse *redshift* decorre da ligação antígeno-anticorpo, que promove transferência de elétrons para o GO. Como discutido na sessão 3.7, essa transferência aumenta a densidade eletrônica alterando o IR efetivo da camada, resultando no deslocamento do espectro^{129–131}. Novamente, uma contribuição na mudança do IR que acontece majoritariamente pelo efeito eletro-óptico (Δn_{eo}) devido à nova

distribuição cargas que, conseqüentemente alteram o potencial eletrostático global influenciando na energia livre de ligação. À medida que a concentração do IL-1 β aumenta, nota-se um deslocamento para comprimentos de onda menores. Atribuímos esse comportamento a adição de massa molecular na superfície da fibra e a reorganização da camada superficial após as ligações, alterando o IR efetivo do modo de propagação^{61,132}. O comportamento observado sugere que, após a ligação inicial e o aumento da densidade eletrônica, a adição de maior quantidade de massa molecular sobre a superfície leva a uma reorganização estrutural da camada superficial. Essa reorganização pode modificar como a luz interage com a superfície da fibra, alterando o IR efetivo na região sensível do sensor, ou seja, uma variação do IR pela contribuição mais acentuada do efeito fotoelástico (Δn_{fe}).

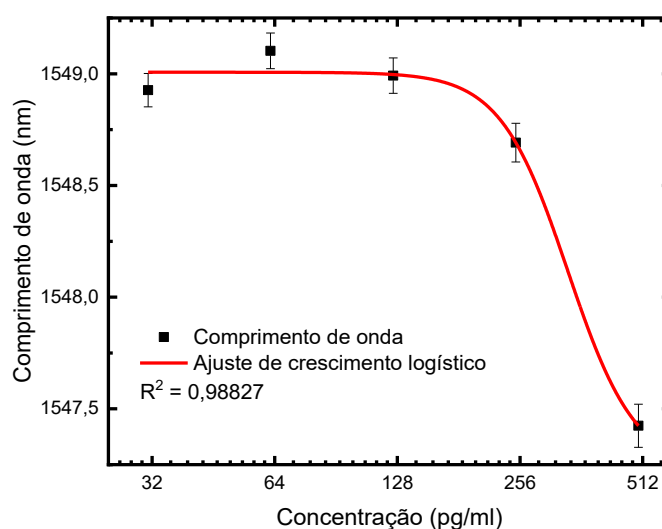
Figura 22 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito.



Na Figura 23, é apresentado o gráfico do deslocamento em função da concentração de IL-1 β . Os pontos pretos com barras de erro representam as médias experimentais e a sua variação. O ponto inicial (1548,93 nm) de um regime de baixa concentração, referente à primeira concentração (31,3 pg/mL) de antígeno. Novamente, fica fácil observar por esse gráfico e pela variação das barras de erro, que o sensor, apesar de deslocar o vale ressonante para maiores comprimentos de onda com relação à referência, não é capaz de

distinguir as três primeiras concentrações. Para 250 pg/mL, no entanto, o biossensor apresentou uma taxa de variação de comprimento de onda de 0,5 nm, demonstrando maior sensibilidade para detecção de IL-1 β . O ponto final (500 pg/mL) apresenta um maior deslocamento ($\sim 1,5$ nm) o que mostra que de fato para a maior concentração do IL-1 β fornece uma quantidade muito maior de ligações, produzindo mudanças significativas no sinal óptico. O ajuste logístico (linha vermelha) apresenta um alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,98827$) o qual é um indicativo de que o modelo é adequado para descrever a relação entre as variáveis desse sistema.

Figura 23 - Gráfico de dispersão com distribuição estatística e modelo de regressão logística dos vales ressonantes.



A partir dos parâmetros obtidos no ajuste de crescimento logístico, é possível calcular a sensibilidade e o limite de detecção (LOD) desse sensor e posteriormente comparar seu desempenho com outros biossensores da literatura. Para calcular a sensibilidade (equação 26), usamos $\lambda_{max} = 1549,10 \pm 0,05$ nm e $\lambda_{min} = 1547,42 \pm 0,05$ nm, e os parâmetros obtido pelo ajuste $p = 5,22$ e $C_0 = 335,43$ pg/mL. A sensibilidade encontrada de $S = 6,51 \cdot 10^{-3}$ ($m \cdot l$)/g, esse valor será usado para encontrar o LOD. Aplicando os valores encontrados, na equação 27 e usando $\sigma_{min} = 0,05$ nm, encontramos o $LOD = 21,45$ pg/ml. Os valores da posição específica de cada vale, seu deslocamento em relação ao zero e o LOD podem ser encontrados na Tabela 2 Tabela 2 - Variação do comprimento de onda ressonante (λ) e deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para diferentes concentrações de IL-1 β .

Tabela 2 - Variação do comprimento de onda ressonante (λ) e deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para diferentes concentrações de IL-1 β .

Concentração (pg/mL)	Comprimento de onda (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
0	1538,40 \pm 0,05	0
31,3	1548,93 \pm 0,05	9,67 \pm 0,07
62,5	1549,10 \pm 0,05	9,84 \pm 0,07
125	1548,99 \pm 0,05	9,73 \pm 0,07
250	1548,69 \pm 0,05	9,43 \pm 0,07
500	1547,42 \pm 0,05	8,16 \pm 0,07

4.2.3 Análise de reutilização

Fizemos um teste baseados em alguns estudos na literatura que visam demonstrar na prática a viabilidade de reutilização do biossensor para duas ou mais medições^{56,60}. Para isso, após a primeira utilização do biossensor é feita uma lavagem da superfície funcionalizada com antígenos com uma solução de 0,01 M de ácido clorídrico (HCL) por 10 minutos⁵⁸. A aplicação dessa solução de HCL, consegue alterar as interações químicas fundamentais envolvidas na imobilização das biomoléculas, removendo assim os compostos ligados^{101,133}. Dentre os compostos, o acoplamento antígeno-anticorpo é mantido por forças não covalentes como ligações iônicas e de hidrogênio, sendo assim interações reversíveis e sensíveis a mudanças no pH do ambiente¹³⁴. Esse tratamento com HCL leva a ionização ácida dos grupos carboxila no GO (COO⁻), convertendo-os em ácido carboxílico (COOH), o que reduz as cargas negativas na superfície funcionalizada. Essa redução de cargas negativas altera a contribuição eletrostática (equação 16) e o excesso de íons H⁺ altera as ligações de hidrogênio (equação 19) desestabilizando o vínculo entre parátopo e epítopo reduzindo a sua contribuição para a energia de ligação. A aplicação dessa solução de HCL também terá impacto nas ligações do BSA com o GO. O BSA interage com o GO principalmente por meio de interações de empilhamento dos grupos aromáticos de

aminoácidos da proteína com os domínios grafiticos e interações eletrostáticas entre os grupos oxigenados do GO^{127,135}.

Em seguida, o sensor foi lavado com PBS para remover todos os compostos não ligados à superfície do GO. A literatura sugere que, nesse processo de lavagem com HCL, não apenas a ligação antígeno-anticorpo é quebrada, mas também a ligação anticorpo-GO, quando estas são suportadas por adsorção física ou pontes eletrostáticas¹³⁶. Sendo assim, nesse processo de reutilização, o biossensor pode perder parcialmente a concentração de anticorpos aderidos à superfície. Por isso, boa parte da literatura recomenda uma nova deposição de anticorpo na superfície, seguindo o mesmo protocolo da primeira utilização que inclui um novo bloqueio com BSA de modo a restaurar a estrutura proposta para o sensor, ou seja, LPG/GO/Anti-IL1 β /BSA.

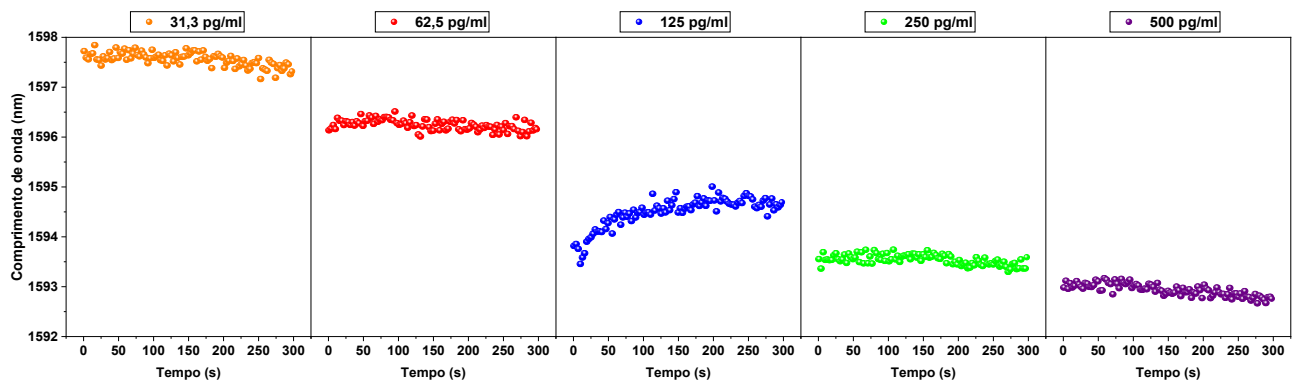
Após essa recomposição da superfície do sensor, foi feito novo teste de detecção do antígeno IL-1 β . Assim como no primeiro teste, o sensor foi incubado em diferentes concentrações do analito, em que cada processo de incubação teve duração de 5 minutos, mantendo o protocolo do primeiro teste. Novamente foram incubadas sequencialmente as mesmas 5 concentrações do IL-1 β , com lavagens com PBS nos intervalos e foi monitorado o vale ressonante ao longo do tempo. A lavagem com PBS entre cada processo é feita para remover o IL-1 β não ligado, e em seguida incubado na concentração seguinte.

A

Figura 24 mostra os deslocamentos dos vales ressonantes em relação ao comprimento de onda para cada concentração. É possível notar que diferentemente do primeiro teste realizado (Figura 21), foi possível detectar e diferenciar a presença de antígeno também para as três concentrações mais baixas (31,3, 62,5, 125 pg/mL). O biossensor realizou a detecção, ou seja, houve uma mudança no IR, que conseqüentemente leva a uma mudança na posição do vale ressonante com relação ao vale de referência (GO/Anticorpo/BSA). Neste segundo teste é possível distinguir uma variação significativa na posição do vale para todas as concentrações do IL-1 β . Este resultado é um indicativo de que durante a lavagem do sensor com HCL existe uma remoção apenas parcial de anticorpos da superfície do GO. E com uma nova deposição de anticorpos na região ativa, é muito provável que o sensor tenha ficado com uma quantidade de sítios ativos de anticorpos maior do que no primeiro teste, ou seja, aumentou o número de sítios de ligação anticorpo-antígeno. Isso explica a grande melhoria na eficiência da funcionalização e da detecção do sensor para as ligações específicas (anti-IL-1 β - IL-1 β). Nesse gráfico o deslocamento do vale ressonante é

representado pelos círculos. Os dados evidenciam deslocamentos para comprimentos de onda menores pelo efeito fotoelástico.

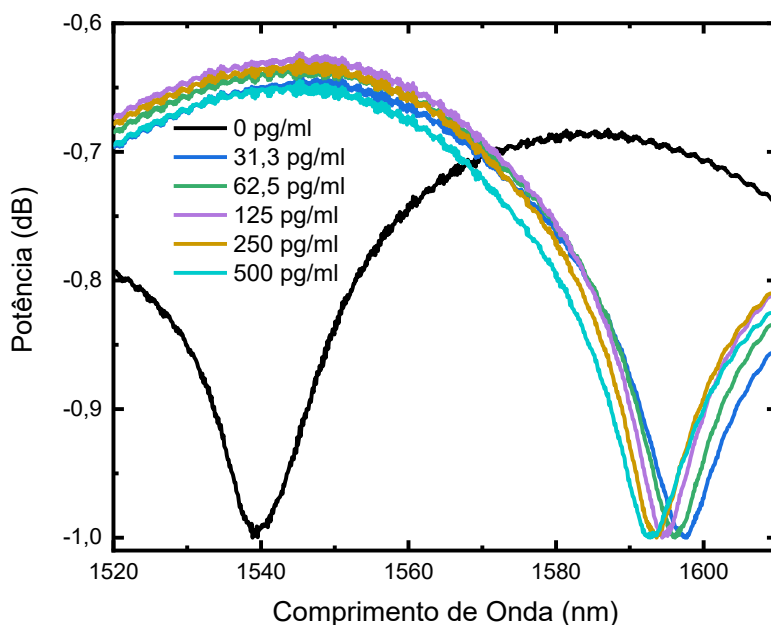
Figura 24 - Gráfico de Comprimento de onda dos vales ressonantes em função do tempo para as diferentes concentrações do anti-IL-1 β , durante o processo de interação ligante após a regeneração.



A Figura 25 mostra o gráfico de potência em função do comprimento de onda do biossensor após a regeneração. Observa-se que o comprimento de onda referente ao zero (curva preta) está centrado em torno de 1538,74 nm, indicando a condição de referência do biossensor com os sítios remanescentes do GO bloqueados por BSA. Vale lembrar que a posição de referência no primeiro teste foi de 1538,40 nm, uma pequena diferença entre essas posições de referência de aproximadamente 0,35 nm. Se lembrarmos que a última posição do vale ressonante no primeiro teste estava em 1547,42 nm depois da adição concentração de 500 pg/mL, podemos dizer de forma geral que a limpeza com HCL realmente remove boa parte dos elementos previamente ligados. E após a nova deposição de anticorpos e BSA a posição do vale retornou para valor muito próximo à referência do primeiro teste. Por outro lado, essa diferença entre as duas referências, corrobora com nossa discussão de que a limpeza não remove completamente os anticorpos previamente ligados

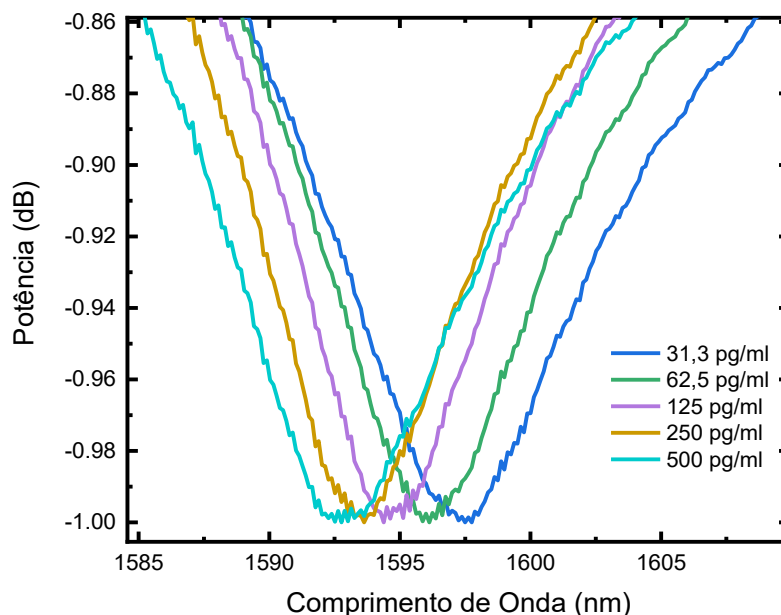
e ao se fazer nova deposição de anticorpos a quantidade final de sítios disponíveis é maior, o que pode justificar a diferença de posição do vale de referência.

Figura 25 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito durante a reutilização.



Assim como visto no primeiro teste, as curvas que correspondem às concentrações do analito demonstraram um *redshift*, resultado das interações pelo efeito eletro-óptico com relação ao primeiro ponto, indicando uma rápida interação de afinidade entre as biomoléculas (anticorpo – antígeno). Para a primeira concentração o vale ressonante foi para 1597,56 nm, com uma variação de 58,82 nm em relação à referência. A partir das demais concentrações a curva continua a se deslocar sistematicamente para comprimentos de onda menores, cujo comportamento é semelhante ao do primeiro teste. A Semelhança entre os resultados corrobora com a explicação de que existem dois regimes de detecção dos antígenos pelo biossensor, que ocorrem devido a soma das contribuições dos efeitos eletro-óptico e fotoelástico. Esse deslocamento pelo efeito fotoelástico (*blueshift*) ocorre devido a maior disponibilidade de sítios de ligação e à adição de massa molecular que se prende a superfície do biossensor e passa a ter maior contribuição que a intensidade das interações eletrostáticas (equação 16). Pode ser visto mais claramente no zoom deste gráfico da Figura 26, o deslocamento da curva mencionado acima.

Figura 26 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito durante a reutilização.

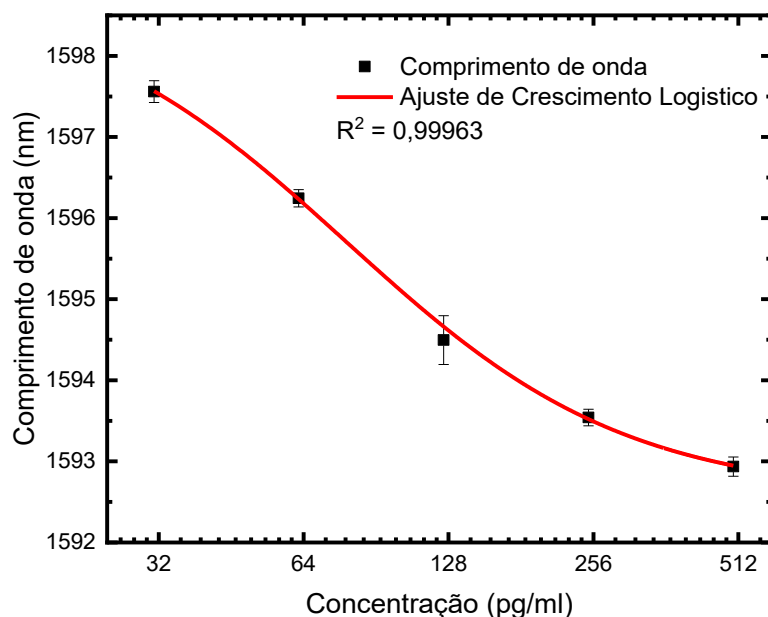


A resposta espectral pode ser observada na Figura 27, que relaciona a posição do vale com a respectiva concentração de IL-1 β . A sensibilidade foi calculada usando a equação 26, com os seguintes parâmetros, $\lambda_{max}=1597,56 \pm 0,05$ nm, $\lambda_{min}=1592,94 \pm 0,05$ nm, $p=1,49$ e $C_0=78,66$ pg/mL. A sensibilidade $S = 21,93 \cdot 10^{-3} (m \cdot l)/g$, foi aplicada na equação 27 e usando $\sigma_{min}=0,04653$ nm, encontramos o LOD=6,37 pg/ml. Os valores da posição específica de cada vale, seu deslocamento em relação ao zero e o LOD podem ser encontrados na Tabela 3.

Em resumo, vimos que a lavagem com HCl faz romper ligações não covalentes, favorecendo a dissociação entre IL-1 β e anti-IL-1 β e entre BSA e GO. Porém, com a aplicação de uma nova deposição de anticorpos e BSA ao sistema, o teste de regeneração apresentou desempenho superior ao primeiro ensaio, devido muito provavelmente a um maior número de sítios ligantes disponíveis para o IL-1 β . Observou-se um aumento de aproximadamente três vezes na sensibilidade do biossensor e na consequente redução de três vezes no LOD. Esse efeito foi atribuído a dois processos eficazes: a limpeza com HCL e a regeneração com deposição de mais anticorpos.

Por fim, cabe destacar que, no presente estudo, não foi possível realizar lavagens subsequentes com HCl nem novas etapas de regeneração com deposições adicionais de anticorpos e BSA, de modo a avaliar o limite máximo de ciclos de reutilização do biossensor. Essa limitação deve-se à elevada fragilidade da fibra óptica, sobretudo na região decapada, desprovida de proteção mecânica, que acabou se rompendo durante os procedimentos. Para a verificação da viabilidade de três ou mais ciclos de deposição, seria necessária a fabricação de novas LPGs, além da aquisição de reagentes biológicos adicionais para a preparação de novos sensores, o que não pôde ser viabilizado no âmbito deste trabalho. Ressalta-se, entretanto, que a equipe responsável pretende retomar essa análise em etapas futuras do projeto.

Figura 27 – Gráfico de dispersão com distribuição estatística e modelo de regressão logística dos vales ressonantes.



O ajuste de crescimento logístico (linha vermelha) aplicado aos dados da Figura 27, apresenta um alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$) corroborando novamente que o modelo é adequado para descrever a relação entre as variáveis desse sistema. Estes resultados juntos indicam que o biossensor baseado em LPG funcionalizada com GO apresenta alta sensibilidade, comportamento previsível e estabilidade espectral, podendo detectar baixíssimas concentrações.

Tabela 3 - Variação do comprimento de onda ressonante (λ) e deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para diferentes concentrações de IL-1 β .

Concentração (pg/mL)	Comprimento de onda (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
BSA	1538,74 \pm 0,05	0
31,3	1597,56 \pm 0,05	58,82 \pm 0,07
62,5	1596,24 \pm 0,05	57,50 \pm 0,07
125	1594,50 \pm 0,05	55,75 \pm 0,07
250	1593,54 \pm 0,05	54,80 \pm 0,07
500	1592,93 \pm 0,05	54,19 \pm 0,07

Os dados da literatura explorados no capítulo 2 apresentam desempenhos relevantes na detecção de diferentes moléculas em variadas plataformas, evidenciando avanços significativos no desenvolvimento de biossensores. Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma melhoria substancial, com LOD de 21,45 pg/mL inicialmente, e uma redução para 6,36 pg/mL após a regeneração, se mostrando três e dez vezes menor que para a referência mais recente⁶¹, como é possível ver na Tabela 4. Esses valores indicam uma sensibilidade aprimorada e maior capacidade de detecção em baixas concentrações.

Tabela 4 - Biossensores ópticos com elementos de reconhecimento biológico incluindo este trabalho.

Transdutor	Revestimento	LOD	Intervalo de detecção	Ano	Referência
LPG	APTES	0,7 μ g/mL	5 – 50 μ g/mL	2000	DeLisa 2000
FBG	GO	0,01 mg/mL	1 – 100 μ g/mL	2015	SRIDEVI 2015
LPG	TiO ₂ -SiO ₂	1 ng/mL	5 – 50 μ g/mL	2015	CHIAVAIOLI 2015
LPG	TiO ₂	0,37 ng/mL	0,37 - 3,7 μ g/mL	2016	COELHO 2016
SPR	TiO ₂	0,37 ng/mL	0,37 - 3,7 μ g/mL	2016	COELHO 2016
dLPG	GO	7 ng/mL	1 – 100 μ g/mL	2017	LIU 2017
OS-LPFG	GO	0,9 mg/mL	0,9 – 4,5 mg/mL	2021	LEE 2021
MTLPFG	GO	25,79 ng/mL	1 – 1000 ng/mL	2023	Kang 2023
MTLPFG		104,6 ng/mL	1 – 1000 ng/mL	2023	Kang 2023
LPG	GO	60 pg/mL	0,01 – 100 ng/mL	2025	SOARES 2025

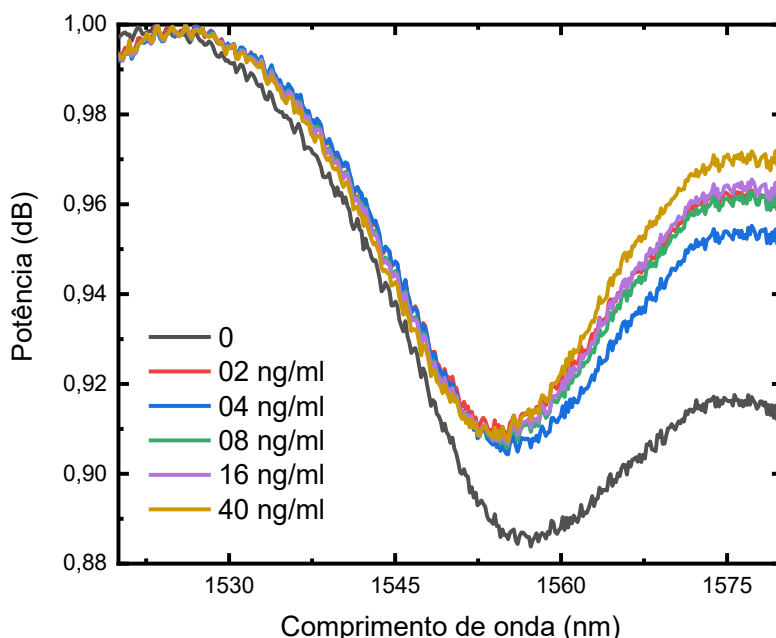
LPG	GO	21,45 pg/mL	31,3 – 500 pg/mL	2025	Este trabalho.
LPG	GO-regenerado	6,37 pg/mL	31,3 – 500 pg/mL	2025	Este trabalho.

4.2.4 Análise da citocina controle com biomoléculas inespecíficas.

Nessa etapa o biossensor foi testado com interleucina-10 (IL-10), usada como citocina controle para verificar a especificidade do sensor para -IL-1 β ¹³⁷. A

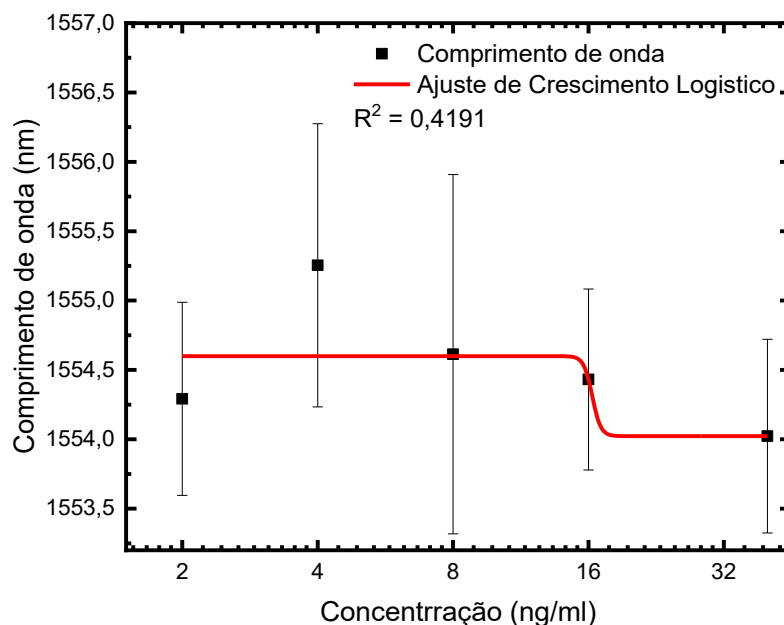
Figura 28 apresenta um gráfico de potência em função do comprimento de onda dos espectros de transmissão do biossensor para diferentes concentrações de IL-10. As concentrações nesse teste foram 2, 4, 8, 16 e 40 ng/mL. Escolhemos usar uma quantidade 1000 vezes mais concentrada de IL-10 que o antígeno específico e com isso assegurar que o biossensor recebesse uma quantidade muito grande de material biológico para termos certeza de sua inespecificidade para essa citocina. Nesse sensor observamos a curva da referência Fibra/GO/Anti-IL-1 β /BSA (linha preta) centrada em 1556,91 nm, configurando o ponto zero. Diferente do visto para o teste específico, a variação do comprimento de onda é mínima, não desempenhando um deslocamento considerável nos comprimentos de onda, em comparação ao teste anterior.

Figura 28 - Gráfico de Potência em função do Comprimento de onda para diferentes concentrações do analito inespecífico.



O vale ressonante se mantém estável em posição, sem demonstrar variações claras associadas ao aumento da concentração do IL-10. Isso evidencia não haver ligações entre o IL-10 e os sítios do biossensor, reforçando a especificidade para o IL-1 β , previamente testado. O pequeno deslocamento para comprimentos menores não configura necessariamente uma ligação química com o anticorpo, mas sim a flutuações que acontecem no espectro devido a interações físicas como forças de van der Waals e aumento da massa de material sobre a área ativa da fibra e que não configuram o biossensoriamento efetivo, com a detecção da citocina⁹⁹. O deslocamento médio se mantém praticamente constante, com pequenas flutuações não significativas e um deslocamento em relação à potência, geralmente associado a interferência do ambiente como mostra a Figura 29. Esse teste evidencia que o contrário do observado para o analito específico, que não há uma variação sistemática do comprimento de onda ressonante com o aumento da concentração do IL-10.

Figura 29 - Gráfico de dispersão com distribuição estatística e modelo de regressão logística dos vales ressonantes para teste inespecífico.



O ajuste de crescimento logístico (linha vermelha) apresenta um coeficiente de determinação muito baixo, isso é um indicativo de que os dados experimentais não se adequam ao modelo. Esse dado demonstra total ausência de relação entre a concentração do IL-10 e a resposta espectral do sensor. Esses resultados reforçam o teste anterior confirmando que o biossensor funcionalizado com anticorpos anti-IL-1 β apresenta elevada seletividade, diferenciando claramente o antígeno alvo dos demais ainda que seja uma citocina estruturalmente semelhante¹³⁸.

Tabela 5 - Variação do comprimento de onda ressonante (λ) e deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para diferentes concentrações de IL-10 (analito controle).

Concentração (pg/mL)	Comprimento de onda (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
BSA	1556,91 ± 0,05	0
2	1554,32 ± 0,05	2,589 ± 0,07
4	1555,53 ± 0,05	1,377 ± 0,07
8	1554,63 ± 0,05	2,279 ± 0,07
16	1554,46 ± 0,05	2,455 ± 0,07
40	1553,93 ± 0,05	2,983 ± 0,07

5 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou, na prática, a fabricação, a funcionalização e a validação de um biossensor óptico baseado em LPFGs, funcionalizadas com GO e anticorpos anti-IL-1 β , visando a detecção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . A conjugação eficiente entre a superfície funcionalizada com GO e os anticorpos específicos possibilitou a construção de um dispositivo sensível e seletivo.

A análise morfológica de MEV confirmou a presença do revestimento na superfície da fibra, enquanto a espectroscopia Raman indicou a conservação da integridade da camada de GO após a deposição da camada biofuncional. O biossensor foi funcionalizado com GO e anticorpos por meio da química de ativação EDC/NHS, além disso, o biossensor foi encapsulado em uma cápsula microfluídica para testes em meio líquido. Demonstramos que a alta densidade de grupos funcionais oxigenados do GO proporcionou ancoragem eficiente dos anticorpos, garantindo seletividade e estabilidade da superfície sensora. Ficou demonstrado também que a detecção está fortemente relacionada à energia livre de ligação envolvida no reconhecimento antígeno-anticorpo, onde contribuições de interações eletrostáticas, forças de van der Waals e pontes de hidrogênio são determinantes para especificidade molecular.

Os ensaios funcionais demonstraram deslocamentos espectrais sistemáticos e consistentes em resposta ao aumento da concentração de IL-1 β , ajustando-se precisamente a um modelo de crescimento logístico proposto. Esse comportamento confirma a previsibilidade da resposta espectral e a robustez da plataforma. A regeneração do sensor, por meio de tratamento químico e nova deposição de anticorpos, ampliou em até três vezes sua sensibilidade e reduziu drasticamente o LOD, evidenciando a possibilidade de reutilização e a viabilidade de aplicações de longo prazo. O biossensor atingiu limites de detecção teóricos de até 6,36 pg/mL após a etapa de regeneração, valores significativamente mais baixos que os reportados recentemente na literatura, o que o posiciona entre os dispositivos mais sensíveis para essa aplicação. Além da elevada sensibilidade, o dispositivo demonstrou excelente seletividade: testes com a citocina controle IL-10, mesmo em concentrações milhares de vezes maiores, resultaram em deslocamentos desprezíveis, comprovando a especificidade para IL-1 β .

Esses resultados reforçam o potencial das LPGs funcionalizadas com GO como transdutores ópticos de alto desempenho em biossensoriamento, sensíveis a variações do índice de refração local por efeitos eletro-ópticos e fotoelásticos, explicando a correlação observada entre o acoplamento óptico e a formação dos complexos biomoleculares. Por fim, ficou demonstrado que essa proposta de biossensor é uma solução promissora para monitoramento de biomarcadores inflamatórios em contextos clínicos. A robustez, a sensibilidade e a adaptabilidade da plataforma tornam-na uma candidata atrativa não somente para aplicações laboratoriais, mas também para o desenvolvimento de sistemas portáteis e multiplexados. Como perspectivas, recomenda-se a validação do sensor com amostras biológicas reais e a expansão da plataforma para detecção simultânea de múltiplos biomarcadores. Esses avanços podem consolidar a tecnologia como alternativa prática, de baixo custo e de alto impacto para diagnósticos rápidos, precisos e alternativos para testes convencionais na medicina personalizada e preventiva.

REFERÊNCIAS

1. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, Englund JA, Lee MJ, Loeb M, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19 (June 2020). *Clinical Infectious Diseases*. 27 de junho de 2024;78(7):e106–32. doi:10.1093/cid/ciaa760
2. Reen DJ. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).
3. Jimenez R, Ramirez R, Carracedo J, Aguera M, Navarro D, Santamaria R, et al. Cytometric bead array (CBA) for the measurement of cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection. *Cytokine*. 7 de outubro de 2005;32(1):45–50. doi:10.1016/j.cyto.2005.07.009
4. Pedreira-Rincón J, Rivas L, Comenge J, Skouridou V, Camprubí-Ferrer D, Muñoz J, et al. A comprehensive review of competitive lateral flow assays over the past decade. *Lab Chip*. 2025;25(11):2578–608. doi:10.1039/D4LC01075B
5. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. dezembro de 2012;380(9859):2095–128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0
6. Golinelli D, Boetto E, Carullo G, Nuzzolese AG, Landini MP, Fantini MP. How the COVID-19 pandemic is favoring the adoption of digital technologies in healthcare: a literature review.
7. Wu Y, Tilley RD, Gooding JJ. Challenges and Solutions in Developing Ultrasensitive Biosensors. *J Am Chem Soc*. 23 de janeiro de 2019;141(3):1162–70. doi:10.1021/jacs.8b09397
8. Silva MMO, Tauro LB, Kikuti M, Anjos RO, Santos VC, Gonçalves TSF, et al. Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings From Surveillance for Acute Febrile Illness. *Clinical Infectious Diseases*. 27 de setembro de 2019;69(8):1353–9. doi:10.1093/cid/ciy1083
9. Chauhan N, Maekawa T, Kumar DNS. Graphene based biosensors—Accelerating medical diagnostics to new-dimensions. *J Mater Res*. agosto de 2017;32(15):2860–82. doi:10.1557/jmr.2017.91
10. Cai J, Liu Y, Shu X. Long-Period Fiber Grating Sensors for Chemical and Biomedical Applications. *Sensors*. 3 de janeiro de 2023;23(1):542. doi:10.3390/s23010542
11. Erdogan T. Cladding-mode resonances in short- and long-period fiber grating filters. *J Opt Soc Am A*. 1º de agosto de 1997;14(8):1760. doi:10.1364/JOSAA.14.001760
12. Alustiza DH, Mineo M, Aredes D, David Gara PM, Arce VB, Russo NA. Sensitivity Improvement of an LPG-based Fiber Optic Humidity Sensor. Em: 2020 IEEE Congreso Bienal de Argentina (ARGENCON) [Internet]. Resistencia, Argentina: IEEE; 2020 [citado 9 de maio de 2025]. p. 1–5. Disponível em:

<https://ieeexplore.ieee.org/document/9505324/>
doi:10.1109/ARGENCON49523.2020.9505324

13. Yin G, Wang Y, Liao C, Zhou J, Zhong X, Wang G, et al. Long Period Fiber Gratings Inscribed by Periodically Tapering a Fiber. *IEEE Photon Technol Lett.* abril de 2014;26(7):698–701. doi:10.1109/LPT.2014.2302901
14. Wang H, Guo JK, Mo H, Zhou X, Han Y. Fiber Optic Sensing Technology and Vision Sensing Technology for Structural Health Monitoring. *Sensors.* 27 de abril de 2023;23(9):4334. doi:10.3390/s23094334
15. Bock WJ, Chen J, Mikulic P, Eftimov T. A Novel Fiber-Optic Tapered Long-Period Grating Sensor for Pressure Monitoring. *IEEE Trans Instrum Meas.* agosto de 2007;56(4):1176–80. doi:10.1109/TIM.2007.899904
16. Singh SA, Kalam MA, Sayyed MB, Selvin R, Hsu HL, Shaikh SF, et al. A promising approach for highly sensitive LPG detection via synergistic effects of Fe nanoparticle modified graphene. *J Mater Sci: Mater Electron.* julho de 2024;35(20):1401. doi:10.1007/s10854-024-13139-6
17. Horta RADS, De Paula JN, Calixto JMF. Avaliação do perfil térmico e calor de hidratação de pastas de cimento com adição de óxido de grafeno. *Matéria (Rio J).* 2022;27(3):e20220151. doi:10.1590/1517-7076-rmat-2022-0151
18. Yokwana K, Ntsendwana B, Nxumalo EN, Mhlanga SD. Recent advances in nitrogen-doped graphene oxide nanomaterials: Synthesis and applications in energy storage, sensor electrochemical applications and water treatment. *Journal of Materials Research.* 14 de julho de 2023;38(13):3239–63. doi:10.1557/s43578-023-01070-1
19. Machado IK, De Oliveira R, Totti MC, Vicentini NC, Nascimento WWG, Fragneaud B, et al. High-Performance Impedance Humidity Sensor Based on Au Nanoparticle-Modified Hydroxyl-Rich Graphene Oxide. *ACS Omega.* 18 de setembro de 2025;acsomega.5c03897. doi:10.1021/acsomega.5c03897
20. Carvalho GR. Aerogel de Óxido de Grafeno como cátodo em novas baterias de Íons Al³⁺ contendo o Líquido Iônico PHPTBR. UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA; 2018.
21. Tao W, Lan Y, Zhang J, Zhu L, Liu Q, Yang Y, et al. Revealing the Chemical Nature of Functional Groups on Graphene Oxide by Integrating Potentiometric Titration and Ab Initio Calculations. *ACS Omega.* 11 de julho de 2023;8(27):24332–40. doi:10.1021/acsomega.3c01596
22. Lorf A, He H, Forster M, Klinowski J. Structure of Graphite Oxide Revisited. *J Phys Chem B.* 1º de junho de 1998;102(23):4477–82. doi:10.1021/jp9731821
23. Siklitskaya A, Gacka E, Larowska D, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Malolepszy A, Stobiński L, et al. Lorf–Klinowski-type models of graphene oxide and reduced graphene oxide are robust in analyzing non-covalent functionalization with porphyrins. *Sci Rep.* 12 de abril de 2021;11(1):7977. doi:10.1038/s41598-021-86880-1

24. Tavares, CT. Tratamento térmico a baixa temperatura em dispersões de Óxido de Grafeno uma análise de suas propriedades ópticas e elétricas. UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA; 2024.
25. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc.* março de 1958;80(6):1339–1339. doi:10.1021/ja01539a017
26. Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, et al. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano.* 24 de agosto de 2010;4(8):4806–14. doi:10.1021/nn1006368
27. Kang JH, Kim T, Choi J, Park J, Kim YS, Chang MS, et al. Hidden Second Oxidation Step of Hummers Method. *Chem Mater.* 9 de fevereiro de 2016;28(3):756–64. doi:10.1021/acs.chemmater.5b03700
28. Lavin-Lopez MDP, Romero A, Garrido J, Sanchez-Silva L, Valverde JL. Influence of Different Improved Hummers Method Modifications on the Characteristics of Graphite Oxide in Order to Make a More Easily Scalable Method. *Ind Eng Chem Res.* 21 de dezembro de 2016;55(50):12836–47. doi:10.1021/acs.iecr.6b03533
29. De Lima AH, Tavares CT, Da Cunha CCS, Vicentini NC, Carvalho GR, Fragneaud B, et al. Origin of optical bandgap fluctuations in graphene oxide. *Eur Phys J B.* junho de 2020;93(6):105. doi:10.1140/epjb/e2020-100578-7
30. de Lima AH. Síntese e Caracterização de Óxido de Grafeno e Aplicações em Eletrônica Orgânica. UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA; 2017.
31. Shen J, Shi M, Yan B, Ma H, Li N, Hu Y, et al. Covalent attaching protein to graphene oxide via diimide-activated amidation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* dezembro de 2010;81(2):434–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.035
32. Yang C. Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking. *Bull Mater Sci.* outubro de 2012;35(5):913–8. doi:10.1007/s12034-012-0376-5
33. Chiu NF, Fan SY, Yang CD, Huang TY. Carboxyl-functionalized graphene oxide composites as SPR biosensors with enhanced sensitivity for immunoaffinity detection. *Biosensors and Bioelectronics.* março de 2017;89:370–6. doi:10.1016/j.bios.2016.06.073
34. Shaikh MS, Liu C, Partridge M, James SW, Zhu WD, Chen X. Highly sensitive and selective biosensor based on graphene oxide coated long period grating. Em: Gannot I, organizador. San Francisco, California, United States; 2017 [citado 2 de maio de 2025]. p. 100580G. Disponível em: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2252371> doi:10.1117/12.2252371
35. Prieto-Simon B, Campas M, Marty JL. Biomolecule Immobilization in Biosensor Development: Tailored Strategies Based on Affinity Interactions. *PPL.* 1º de agosto de 2008;15(8):757–63. doi:10.2174/092986608785203791

36. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL.* 2003;111(2).
37. Mobed A, Shakouri SK, Dolati S. Biosensors: A novel approach to and recent discovery in detection of cytokines. *Cytokine.* dezembro de 2020;136:155272. doi:10.1016/j.cyto.2020.155272
38. Melo GR, Pereira CL, Carvalho KF, Rodrigues MC, Ribeiro MDMG. Mecanismos imunológicos e inflamatórios na patogênese da artrite reumatoide: papel das citocinas, autoanticorpos e disfunção endotelial. *Braz J Hea Rev.* 7 de fevereiro de 2025;8(1):e77412. doi:10.34119/bjhrv8n1-342
39. Zhang H, Dhalla NS. The Role of Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *IJMS.* 16 de janeiro de 2024;25(2):1082. doi:10.3390/ijms25021082
40. Xiao Z, Singh S, Singh M. Improving cancer immunotherapy by targeting IL-1. *Oncolmunology.* janeiro de 2021;10(1):2008111. doi:10.1080/2162402X.2021.2008111
41. Schultheiß C, Willscher E, Paschold L, Gottschick C, Klee B, Henkes SS, et al. The IL-1 β , IL-6, and TNF cytokine triad is associated with post-acute sequelae of COVID-19. *Cell Reports Medicine.* junho de 2022;3(6):100663. doi:10.1016/j.xcrm.2022.100663
42. Wu X, Dai B, Yan F, Chen Y, Xu Y, Xia Q, et al. Serum Cortisol, Nesfatin-1, and IL-1 β : Potential Diagnostic Biomarkers in Elderly Patients with Treatment-Resistant Depression. *CIA.* abril de 2022;Volume 17:567–76. doi:10.2147/CIA.S361459
43. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet.* março de 2020;395(10229):1033–4. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0
44. Catalfamo M, Le Saout C, Lane HC. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* agosto de 2012;23(4–5):207–14. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.05.007
45. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology.* janeiro de 2021;93(1):250–6. doi:10.1002/jmv.26232
46. Hiti L, Markovič T, Lainscak M, Farkaš Lainščak J, Pal E, Mlinarič-Raščan I. The immunopathogenesis of a cytokine storm: The key mechanisms underlying severe COVID-19. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* abril de 2025;82:1–17. doi:10.1016/j.cytogfr.2024.12.003
47. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, Englund JA, Lee MJ, Loeb M, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19 (June 2020). *Clinical Infectious Diseases.* 27 de junho de 2024;78(7):e106–32. doi:10.1093/cid/ciaa760
48. McGonagle D, O'Donnell JS, Sharif K, Emery P, Bridgewood C. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia. *The Lancet Rheumatology.* julho de 2020;2(7):e437–45. doi:10.1016/S2665-9913(20)30121-1

49. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. abril de 2019;50(4):778–95. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012
50. Mohankumar P, Ajayan J, Mohanraj T, Yasodharan R. Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. *Measurement*. janeiro de 2021;167:108293. doi:10.1016/j.measurement.2020.108293
51. Engvall E. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*. 1º de fevereiro de 2010;56(2):319–20. doi:10.1373/clinchem.2009.127803
52. DeLisa MP, Zhang Z, Shiloach M, Pilevar S, Davis CC, Sirkis JS, et al. Evanescent Wave Long-Period Fiber Bragg Grating as an Immobilized Antibody Biosensor. *Anal Chem*. 1º de julho de 2000;72(13):2895–900. doi:10.1021/ac9912395
53. Chiavaioli F, Baldini F, Tombelli S, Trono C, Giannetti A. Biosensing with optical fiber gratings. *Nanophotonics*. 7 de junho de 2017;6(4):663–79. doi:10.1515/nanoph-2016-0178
54. Sridevi S, Vasu KS, Asokan S, Sood AK. Sensitive detection of C-reactive protein using optical fiber Bragg gratings. *Biosensors and Bioelectronics*. março de 2015;65:251–6. doi:10.1016/j.bios.2014.10.033
55. Chiavaioli F, Biswas P, Trono C, Jana S, Bandyopadhyay S, Basumallick N, et al. Sol-Gel-Based Titania-Silica Thin Film Overlay for Long Period Fiber Grating-Based Biosensors. *Anal Chem*. 15 de dezembro de 2015;87(24):12024–31. doi:10.1021/acs.analchem.5b01841
56. Coelho L, Marques Martins De Almeida JM, Santos JL, Da Silva Jorge PA, Martins MCL, Viegas D, et al. Aptamer-based fiber sensor for thrombin detection. *J Biomed Opt*. 18 de agosto de 2016;21(8):087005. doi:10.1117/1.JBO.21.8.087005
57. Universidad Pontificia Bolivariana, Martínez-Sánchez LM, Álvarez-Hernández LF, Universidad Pontificia Bolivariana, Ruiz-Mejía C, Universidad Pontificia Bolivariana, et al. Hemofilia: abordaje diagnóstico y terapéutico. *Rev Fac Nac Salud Pública*. 30 de abril de 2018;36(2):85–93. doi:10.17533/udea.rfnsp.v36n2a11
58. Liu C, Cai Q, Xu B, Zhu W, Zhang L, Zhao J, et al. Graphene oxide functionalized long period grating for ultrasensitive label-free immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. agosto de 2017;94:200–6. doi:10.1016/j.bios.2017.03.004
59. Lee SL, Kim J, Choi S, Han J, Lee YW. Optical glucose detection using birefringent long-period fiber grating functionalized with graphene oxide. *Opt Eng*. 5 de agosto de 2021;60(08). doi:10.1117/1.OE.60.8.087102
60. Kang X, Wang R, Jiang M, Li E, Li Y, Wang T, et al. A label-free biosensor for pepsin detection based on graphene oxide functionalized micro-tapered long period fiber grating. *Sensors and Actuators Reports*. junho de 2023;5:100139. doi:10.1016/j.snr.2023.100139
61. Soares S, Giannetti A, Esposito F, Sansone L, Srivastava A, Campopiano S, et al. Cortisol detection using a Long Period Fiber Grating Immunosensor coated with

Graphene Oxide. *Sensors and Actuators Reports*. junho de 2025;9:100279. doi:10.1016/j.snr.2024.100279

62. Patela S, Wielichowski M, Lis S, Ptasiński K. *Electronics, Photonics, Microsystems*.
63. Agrawal GP. *Sistemas de comunicação por fibra óptica*. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier; 2014.
64. *Comunicações em fibras ópticas*. Amgh; 2021.
65. Kawano K, Kitoh T. *Introduction to Optical Waveguide Analysis: Solving Maxwell's Equations and the Schrödinger Equation* [Internet]. 1º ed. Wiley; 2001 [citado 11 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471221600> doi:10.1002/0471221600
66. Kerimov MK. Studies on the zeros of Bessel functions and methods for their computation. *Comput Math and Math Phys*. setembro de 2014;54(9):1337–88. doi:10.1134/S0965542514090073
67. Snyder AW. Understanding monomode optical fibers. *Proc IEEE*. 1981;69(1):6–13. doi:10.1109/PROC.1981.11917
68. Addanki S, Amiri IS, Yupapin P. Review of optical fibers-introduction and applications in fiber lasers. *Results in Physics*. setembro de 2018;10:743–50. doi:10.1016/j.rinp.2018.07.028
69. Esposito F, Ranjan R, Campopiano S, Iadicicco A. Arc-Induced Long Period Gratings from Standard to Polarization-Maintaining and Photonic Crystal Fibers. *Sensors*. 20 de março de 2018;18(3):918. doi:10.3390/s18030918
70. Rego G, Marques PVS, Santos JL, Salgado HM. Arc-Induced Long-Period Gratings. *Fiber and Integrated Optics*. maio de 2005;24(3–4):245–59. doi:10.1080/01468030590922975
71. Cascardo Carneiro A, López Barbero AP. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DOS SENSORES ÓPTICOS BASEADOS EM GRADES EM FIBRAS ÓPTICAS E SUA IMPORTÂNCIA NAS DIFERENTES ÁREAS TECNOLÓGICAS. *Engevista*. 8 de abril de 2014;16(4):389. doi:10.22409/engevista.v16i4.574
72. Corning® SMF-28e+® Optical Fiber.
73. Vengsarkar AM, Lemaire PJ, Judkins JB, Bhatia V, Erdogan T. eriod Fiber ratings as ejection.
74. Martinez-Rios A, Monzon-Hernandez D, Torres-Gomez I, Salceda-Delgado G. Long Period Fibre Gratings. Em: Yasin Moh, organizador. *Fiber Optic Sensors* [Internet]. InTech; 2012 [citado 2 de maio de 2025]. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/fiber-optic-sensors/long-period-fibre-gratings> doi:10.5772/27727
75. Thorlabs.com - Controlador do Motor Auxiliar CC do T-Cube.

76. Thorlabs.com - 50 mm (1.97") Compact Motorized Translation Stage.
77. Lima AH, Mendonça JP, Duarte M, Stavale F, Legnani C, De Carvalho GSG, et al. Reduced graphene oxide prepared at low temperature thermal treatment as transparent conductors for organic electronic applications. *Organic Electronics*. outubro de 2017;49:165–73. doi:10.1016/j.orgel.2017.05.054
78. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev*. 2010;39(1):228–40. doi:10.1039/B917103G
79. Scouten W, Luong J, Stephenbrown R. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends in Biotechnology*. maio de 1995;13(5):178–85. doi:10.1016/S0167-7799(00)88935-0
80. Fernandes ACP, Vicentini NC, Couto MS, Carvalho GR, Fragneaud B, Legnani C, et al. High-Sensitivity CO₂ Sensor Based on a Graphene Oxide Coated Long-Period Fiber Grating. *ACS Omega*. 28 de maio de 2025. doi:10.1021/acsomega.5c00184
81. Esposito F, Sansone L, Srivastava A, Baldini F, Campopiano S, Chiavaioli F, et al. Long period grating in double cladding fiber coated with graphene oxide as high-performance optical platform for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. janeiro de 2021;172:112747. doi:10.1016/j.bios.2020.112747
82. Chiavaioli F, Gouveia C, Jorge P, Baldini F. Towards a Uniform Metrological Assessment of Grating-Based Optical Fiber Sensors: From Refractometers to Biosensors. *Biosensors*. 21 de junho de 2017;7(2):23. doi:10.3390/bios7020023
83. Baldini F, Brenici M, Chiavaioli F, Giannetti A, Trono C. Optical fibre gratings as tools for chemical and biochemical sensing. *Anal Bioanal Chem*. janeiro de 2012;402(1):109–16. doi:10.1007/s00216-011-5492-3
84. Thorlabs.com - Optical Spectrum Analyzers.
85. Felipe Oliveira Barino. process_spectra [Internet]. GitHub; 2021. (Software). Disponível em: https://github.com/felipebarino/process_spectra
86. Acharya D, Rani A, Agarwal S, Singh V. Application of adaptive Savitzky–Golay filter for EEG signal processing. *Perspectives in Science*. setembro de 2016;8:677–9. doi:10.1016/j.pisc.2016.06.056
87. Mulvaney SP, Keating CD. Raman Spectroscopy. *Anal Chem*. 1º de junho de 2000;72(12):145–58. doi:10.1021/a10000155
88. Keresztury G. Raman Spectroscopy: Theory. Em: Chalmers JM, Griffiths PR, organizadores. *Handbook of Vibrational Spectroscopy* [Internet]. 1º ed. Wiley; 2001 [citado 10 de agosto de 2025]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470027320.s0109> doi:10.1002/0470027320.s0109
89. Pepino RDO. Desenvolvimento de géis e esponjas de quitosana e blendas quitosana/gelatina em ácido adípico [Mestrado em Química Analítica e Inorgânica] [Internet]. [São Carlos]: Universidade de São Paulo; 2016 [citado 11 de setembro de

- 2025]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-19042016-162109/> doi:10.11606/D.75.2016.tde-19042016-162109
90. Dixit CK, Vashist SK, MacCraith BD, O’Kennedy R. Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays. *Nat Protoc.* abril de 2011;6(4):439–45. doi:10.1038/nprot.2011.304
 91. Novotny J, Sharp K. Electrostatic fields in antibodies and antibody/antigen complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 1992;58(3):203–24. doi:10.1016/0079-6107(92)90006-R
 92. Roberts D, Keeling R, Tracka M, Van Der Walle CF, Uddin S, Warwicker J, et al. The Role of Electrostatics in Protein–Protein Interactions of a Monoclonal Antibody. *Mol Pharmaceutics.* 7 de julho de 2014;11(7):2475–89. doi:10.1021/mp5002334
 93. Chandler D, Percus JK. Introduction to Modern Statistical Mechanics [Internet]. V. 41. 1988 [citado 30 de agosto de 2025]. Disponível em: <https://pubs.aip.org/physicstoday/article/41/12/114/405152/Introduction-to-Modern-Statistical-Mechanics>
 94. Southall NT, Dill KA. The Mechanism of Hydrophobic Solvation Depends on Solute Radius. *J Phys Chem B.* 1º de fevereiro de 2000;104(6):1326–31. doi:10.1021/jp992860b
 95. Sinha N, Mohan S, Lipschultz CA, Smith-Gill SJ. Differences in Electrostatic Properties at Antibody–Antigen Binding Sites: Implications for Specificity and Cross-Reactivity. *Biophysical Journal.* dezembro de 2002;83(6):2946–68. doi:10.1016/S0006-3495(02)75302-2
 96. Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, et al. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc Chem Res.* 1º de dezembro de 2000;33(12):889–97. doi:10.1021/ar000033j
 97. Rashin AA, Honig B. Reevaluation of the Born model of ion hydration. *J Phys Chem.* dezembro de 1985;89(26):5588–93. doi:10.1021/j100272a006
 98. Braden BC, Poljak RJ. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB j.* janeiro de 1995;9(1):9–16. doi:10.1096/fasebj.9.1.7821765
 99. Baldwin RL. Weak Interactions in Protein Folding: Hydrophobic Free Energy, van der Waals Interactions, Peptide Hydrogen Bonds, and Peptide Solvation. Em: Buchner J, Kiefhaber T, organizadores. *Protein Folding Handbook* [Internet]. 1º ed. Wiley; 2005 [citado 11 de setembro de 2025]. p. 127–62. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527619498.ch6> doi:10.1002/9783527619498.ch6
 100. Ludwig V, De Mendonça JPA, De Lima AH, Da Costa Ludwig ZM, Junqueira GMA, Quirino WG, et al. Graphene oxide in water: a systematic computational experimental study. *Graphene Technol.* junho de 2020;5(1–2):1–8. doi:10.1007/s41127-019-00028-7

101. Hubbard RE, Kamran Haider M. Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. Em: Encyclopedia of Life Sciences [Internet]. 1º ed. Wiley; 2010 [citado 11 de setembro de 2025]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0003011.pub2>
doi:10.1002/9780470015902.a0003011.pub2
102. Mayo SL, Olafson BD, Goddard WA. DREIDING: a generic force field for molecular simulations. J Phys Chem. dezembro de 1990;94(26):8897–909. doi:10.1021/j100389a010
103. Pace CN, Fu H, Lee Fryar K, Landua J, Trevino SR, Schell D, et al. Contribution of hydrogen bonds to protein stability. Protein Science. maio de 2014;23(5):652–61. doi:10.1002/pro.2449
104. Nielsen JE, Vriend G. Optimizing the hydrogen-bond network in Poisson–Boltzmann equation-based pK_a calculations. Proteins. junho de 2001;43(4):403–12. doi:10.1002/prot.1053
105. Kitano DC. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira- UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Elétrica. Especialidade: Automação. 2013.
106. Shih CC, Yariv A. A theoretical model of the linear electro-optic effect. J Phys C: Solid State Phys. 10 de fevereiro de 1982;15(4):825–46. doi:10.1088/0022-3719/15/4/027
107. Wang A, He S, Fang X, Jin X, Lin J. Optical fiber pressure sensor based on photoelasticity and its application. J Lightwave Technol. outubro de 1992;10(10):1466–72. doi:10.1109/50.166790
108. Bi H, Yin K, Xie X, Ji J, Wan S, Sun L, et al. Ultrahigh humidity sensitivity of graphene oxide. Sci Rep. 19 de setembro de 2013;3(1):2714. doi:10.1038/srep02714
109. Novotny J, Sharp K. Electrostatic fields in antibodies and antibody/antigen complexes. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 1992;58(3):203–24. doi:10.1016/0079-6107(92)90006-R
110. Sillero A, Ribeiro JM. Isoelectric points of proteins: Theoretical determination. Analytical Biochemistry. junho de 1989;179(2):319–25. doi:10.1016/0003-2697(89)90136-X
111. Brattsand M. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF INTERLEUKIN 1b FROM HUMAN PLANTAR STRATUM CORNEUM. EVIDENCE OF INTERLEUKIN 1b PROCESSING IN VIVO NOT INVOLVING INTERLEUKIN 1b CONVERTASE.
112. Wang A, He S, Fang X, Jin X, Lin J. Optical fiber pressure sensor based on photoelasticity and its application. J Lightwave Technol. outubro de 1992;10(10):1466–72. doi:10.1109/50.166790
113. Barlow A, Payne D. The stress-optic effect in optical fibers. IEEE J Quantum Electron. maio de 1983;19(5):834–9. doi:10.1109/JQE.1983.1071934

114. Bertholds A, Dandliker R. Deformation of single-mode optical fibers under static longitudinal stress. *J Lightwave Technol.* 1987;5(7):895–900. doi:10.1109/JLT.1987.1075583
115. Liu X, Aizen R, Freeman R, Yehezkeli O, Willner I. Multiplexed Aptasensors and Amplified DNA Sensors Using Functionalized Graphene Oxide: Application for Logic Gate Operations. *ACS Nano.* 24 de abril de 2012;6(4):3553–63. doi:10.1021/nn300598q
116. Kato LA, Bellini M. Atribuição de significados biológicos às variáveis da equação logística: uma aplicação do Cálculo nas Ciências Biológicas. *Ciênc educ (Bauru).* 2009;15(1):175–88. doi:10.1590/s1516-73132009000100011
117. Tsoularis A, Wallace J. Analysis of logistic growth models. *Mathematical Biosciences.* julho de 2002;179(1):21–55. doi:10.1016/S0025-5564(02)00096-2
118. Liu Y, Dong X, Chen P. Biological and chemical sensors based on graphene materials. *Chem Soc Rev.* 2012;41(6):2283–307. doi:10.1039/C1CS15270J
119. Estevez MC, Alvarez M, Lechuga LM. Integrated optical devices for lab-on-a-chip biosensing applications. *Laser & Photonics Reviews.* 16 de julho de 2012;6(4):463–87. doi:10.1002/lpor.201100025
120. Dennison J, Holtz M, Swain G. Raman Spectroscopy of Carbon Materials.
121. Childres I, Jauregui LA, Park W, Cao H, Chen YP. RAMAN SPECTROSCOPY OF GRAPHENE AND RELATED MATERIALS.
122. Ferraro, John R., et al. *Introductory Raman Spectroscopy.* 2nd ed, Academic Press, 2003.
123. Eda G, Fanchini G, Chhowalla M. Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material. *Nature Nanotech.* maio de 2008;3(5):270–4. doi:10.1038/nnano.2008.83
124. Ferrari AC, Meyer JC, Scardaci V, Casiraghi C, Lazzeri M, Mauri F, et al. The Raman Fingerprint of Graphene. *Phys Rev Lett.* 30 de outubro de 2006;97(18):187401. doi:10.1103/PhysRevLett.97.187401
125. Graf D, Molitor F, Ensslin K, Stampfer C, Jungen A, Hierold C, et al. Spatially Resolved Raman Spectroscopy of Single- and Few-Layer Graphene. *Nano Lett.* 1º de fevereiro de 2007;7(2):238–42. doi:10.1021/nl061702a
126. Dalton LR, Sullivan PA, Bale DH. Electric Field Poled Organic Electro-optic Materials: State of the Art and Future Prospects. *Chem Rev.* 13 de janeiro de 2010;110(1):25–55. doi:10.1021/cr9000429
127. Jahanban-Esfahlan A, Ostadrahimi A, Jahanban-Esfahlan R, Roufegarinejad L, Tabibiazar M, Amarowicz R. Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules.* outubro de 2019;138:602–17. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.096

128. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol.* 1º de abril de 2009;27(1):519–50. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
129. Fernandes ACP, Vicentini NC, Couto MS, Carvalho GR, Fragneaud B, Legnani C, et al. High-Sensitivity CO₂ Sensor Based on a Graphene Oxide Coated Long-Period Fiber Grating. *ACS Omega.* 10 de junho de 2025;10(22):22874–83. doi:10.1021/acsomega.5c00184
130. Zhang Q, Zhang D, Lu Y, Yao Y, Li S, Liu Q. Graphene oxide-based optical biosensor functionalized with peptides for explosive detection. *Biosensors and Bioelectronics.* junho de 2015;68:494–9. doi:10.1016/j.bios.2015.01.040
131. Mulvaney P. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles. *Langmuir.* 1º de janeiro de 1996;12(3):788–800. doi:10.1021/la9502711
132. Esposito F, Sansone L, Srivastava A, Baldini F, Campopiano S, Chiavaioli F, et al. Long period grating in double cladding fiber coated with graphene oxide as high-performance optical platform for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics.* janeiro de 2021;172:112747. doi:10.1016/j.bios.2020.112747
133. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* janeiro de 2007;96(1):1–26. doi:10.1002/jps.20727
134. Ferreira LF, Lemos L, Lanzi P de A, Peres RE. *Relação Antígeno-Anticorpo.* 2009.
135. Goode JA, Rushworth JVH, Millner PA. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir.* 16 de junho de 2015;31(23):6267–76. doi:10.1021/la503533g
136. Yeung YG, Stanley ER. A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobings. *Analytical Biochemistry.* junho de 2009;389(1):89–91. doi:10.1016/j.ab.2009.03.017
137. Glocker E, Kotlarz D, Klein C, Shah N, Grimbacher B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences.* dezembro de 2011;1246(1):102–7. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06339.x
138. Abubakar M, Rasool HF, Javed I, Raza S, Abang L, Hashim MMA, et al. Comparative Roles of IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IL-22, IL-33, and IL-37 in Various Cardiovascular Diseases With Potential Insights for Targeted Immunotherapy. *Cureus.* 26 de julho de 2023. doi:10.7759/cureus.42494