UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO MODIFICADAS COM CLAVANINA A EM CAMADAS AUTOMONTADAS DE CISTEÍNA PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

JULIANA LIMA DE MIRANDA

RECIFE

2016

JULIANA LIMA DE MIRANDA

SENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO MODIFICADAS COM CLAVANINA A EM CAMADAS AUTOMONTADAS DE CISTEÍNA PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica – PPGIT da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

RECIFE

2016

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Miranda, Juliana Lima de
Sensor impedimétrico baseado em nanopartículas de ouro modificadas com Clavanina A em camadas automontadas de cisteína para detecção de bactérias / Recife: O Autor, 2016.

93 folhas : il., fig., tab.
Orientador: César Augusto Souza de Andrade
Coorientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Nanotecnologia 2. Infecção hospitalar 3. Bactérias I. Andrade, César Augusto Souza de (orientador) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorientadora) III. Título

620.5 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2017-049

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 29 de julho de 2016

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 29 de julho de 2016, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Isaac Aarón Morales Frías

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

Aos meus pais, irmãos e amigos,

... por todo carinho, amor, paciência...

...dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus! Sem Ele nada disso seria possível, por Seu amparo nos momentos difíceis, pela força interior para superar as dificuldades, por me mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu Anjo da Guarda, por sempre me acompanhar e proteger de todos os perigos.

Ao meu pai, que lutou e ainda luta para construção da minha educação.

A minha mãe, por toda paciência, entendimento e apoio em minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Cesar Andrade, pelos conhecimentos adquiridos, pela oportunidade de conhecer essa área inovadora, além da compreensão e amizade.

A minha co-orientadora Profa. Maria Danielly, por toda amizade, paciência e suporte.

Aos meus amigos, obrigada pelos conselhos e direcionamentos, foram essenciais para conclusão de mais essa etapa.

Ao meu amigo Auvani Antunes, sempre presente em minha vida desde a graduação.

A minha amiga Flávia Garcia, por ter me levado ate o Bionano, sem você amiga esse sonho não seria possível.

A minha amiga Kalline Lourenço, por me ajudar sempre que precisei, obrigada pelo seu apoio.

A minha amiga Gisele Bonfim, que sempre estive ao meu lado dando força e apoio.

Aos meus colegas do laboratório, cada um teve uma contribuição importante para conclusão desta etapa.

Ao secretário do PPGIT, Paulo Germano pelo essencial apoio e boa vontade em ajudar sempre que necessário.

À FACEPE pelo apoio Financeiro.

Obrigada!

“Peçam, e lhes será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta lhes será aberta. Pois o que pede, recebe; o que busca, encontra; e àquele que bate, a porta será aberta.”

Mateus 7:7,8

RESUMO

SENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO MODIFICADAS COM CLAVANINA A EM CAMADAS AUTOMONTADAS DE CISTEÍNA PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

As infecções hospitalares são uma das principais causas de morte e aumento da morbidade entre pacientes hospitalizados. O grupo de patógenos associados a estas infecções são denominadas bactérias oportunistas. *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* são bacterias importantes associadas a infecções hospitalares. As nanopartículas de ouro (AuNPs) e peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido amplamente estudados visando o desenvolvimento de biossensores mais eficazes. Cisteína (Cys) é um aminoácido comumente usado para a modificação da superfície de AuNPs devido ao seu grupo tiol que se liga espontaneamente às superfícies metálicas. A Clavanina A (ClavA) é um PAM que se destaca por apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas (BGN) e Gram-positivas (BGP). O objetivo desse trabalho foi o estudo das propriedades eletroquímicas do sistema AuNPsCysClavA visando o desenvolvimento de um biossensor para a identificação de BGN e BGP. O processo da modificação do eletrodo foi avaliada por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e a voltametria cíclica (VC). EIE e VC foram utilizadas em uma faixa de frequência de 100 mHz e 100 KHz e faixa de varredura de -0,2V para 0,7V, respectivamente. Um aumento gradual do diâmetro do semicírculo Cole-Cole foi observada depois de cada passo da modificação do eletrodo. Como esperado, uma resposta semelhante foi observada na resistência de transferência de carga (R_{CT}) devido à adsorção dos componentes do sensor. O aumento do R_{CT} é mais evidente após a adsorção do BGN e BGP. Foram observadas as respostas mais significativas para *S. typhimurium* e *E. coli.* Além disso, os voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro limpo mostraram picos anódicos e catódicos bem definidos. Subsequentemente, uma diminuição dos picos anódicos e catódicos foi mais expressa após a adsorção de *S. typhimurium* e *E. coli.* Os resultados mostraram uma boa sensibilidade do sensor. O biossensor proposto pode ser uma alternativa viável para a detecção específica das bactérias.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias, biossensor, espectroscopia de impedância, voltametria cíclica, nanopartículas de ouro, peptídeo antimicrobiano.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A NANOSTRUCTURED BIOSENSOR BASED ON CLAVANIN A FOR BACTERIA DETECTION

Nosocomial infections are a major cause of death and increased morbidity among hospitalized patients. The group of pathogens associated to these infections are denominated opportunistic bacteria. *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* are important bacteria associated to nosocomial infections. Gold nanoparticles (AuNPs) and antimicrobial peptides (AMPs) have been extensively investigated aiming the development of more effective biosensors. Cysteine (Cys) is an amino acid commonly used for surface modification of AuNPs due to its thiol group that spontaneously bind to metal surfaces. Clavanin A (ClavA) is an AMP with activity against Gram-negative (GNB) and Gram-positive (GPB) bacteria. The objective of this work was to study the electrochemical properties of ClavACysAuNPs system for the development of a biosensor to identify GNB and BGP. The stepwise process of the electrode modification was evaluated by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). EIS and CV were recorded in a frequency range of 100 mHz to 100 KHz and scan range of -0.2V to 0.7V, respectively. A gradual increase of the Cole-Cole semicircle diameter was observed after each step of the electrode modification. As expected, a similar response was observed in the charge transfer resistance (R_{CT}) due to the adsorption of the components of the sensor. The R_{CT} increase is more evident after adsorption of the NBG and GPB. The most significant responses were observed for *S. typhimurium* and *E. coli*. In addition, cyclic voltammograms of the bare gold electrode showed well-defined anodic and cathodic peaks. Subsequently, a decrease in the cathodic and anodic peaks are more expressed after adsorption of *S. typhimurium* and *E. coli*. The results showed a good sensitivity of the sensor. The proposed biosystem can be a viable alternative for specific detection of bacteria.

KEYWORDS: Bacteria, biosensor, impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, gold nanoparticles and antimicrobial peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem de uso de antibióticos sem prescrição médica nos diferentes países. São descritas em vermelho as áreas que apresentam mais de 50 % de uso de antibióticos sem prescrição médica, em roxo às que apresentam entre 20 e 50 %, em verde entre 5 e 19 % e em azul àquelas com menos de 5 %.....19

Figura 2 – Microscopia representativa de bacilos Gram-negativos.....20

Figura 3 – Microscopia representativa de cocos Gram-positivos.....22

Figura 4 – Esquema representando o funcionamento de um biossensor.....25

Figura 5 – Microscopia representativa de AuNps.....28

Figura 6 – Tunicado *Styela clava*, do qual é extraído Clavanina A e sua estrutura em alfa-hélice.....29

Figura 7 - Múltiplas atividades relacionadas a funções antimicrobianas e imunomodulatórias, apresentadas por diversos PAMs.....30

Figura 8 – Voltamograma cíclico.....32

Figura 9 - Circuito do tipo Randles (no topo) e sua resposta idealizada no plano de impedância complexa.....34

Figura 10 - Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica.....36

Figura 11 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente.....37

Figura 12 - Representação esquemática da construção do biossensor.....42

Figura 13 – Imagens representativas do AFM do sistema AuNPsCysClavA e exposto a *S. aureus, E. faecalis, S. typhimurium* e *E. coli*.....45

Figura 14 - Voltamograma cíclico do sensor expostos a *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.....46

Figura 15 - Variação do pico de corrente anódica do sensor na presença de *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.....48

Figura 16 - Diagramas de Nyquist do eletrodo de ouro (●) e AuNPsClavA (●). Inserção: Circuito equivalente de Randles.....49

Figura 17 - Diagramas de Nyquist do sensor expostos a *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.....51

Figura 18 – Δ_{RCT}% do sistema sensor, após a exposição de diferentes concentrações das bactérias.....54

Figura 19 - Grau de revestimento de superfície na presença de *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mudança dos picos anódicos do sensor antes e após a interação com bactérias……47

Tabela 2 - Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância.....52

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs	Nanopartículas de ouro
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
ClavA	Clavanina A
Cys	Cisteína
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
SUS	Sistema único de saúde
EDC	1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxissuccinimida
BGN	Bactérias Gram-negativas
BGP	Bactérias Gram-positivas
LPS	Lipopolissacarídeo
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
POCT	Ponto de atendimento (do inglês Point-of-care)
SPR	Ressonância de plasmon de superfície (do inglês Surface Plasmon Resonace)
VC	Voltametria cíclica
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
Epc	Potencial de pico catódico
Epa	Potencial de pico anódico
Ipc	Corrente de pico catódico
Ipa	Corrente de pico anódico
U	Potencial
W	Impedância de Wardburg

R_e	Resistência eletrolítica
R_{TC}	Resistência de transferência de carga (Ω)
Z”	Impedância real (Ω)
Z’	Impedância imaginária (Ω)
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês Atomic Force Microscopy)
C_{dl}	Capacitância da dupla camada elétrica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....15

2. REVISÃO DA LITERATURA.....18

2.1 Infecção Hospitalar.....18

2.2 Bactérias Gram-negativas.....19

2.2.1 *Escherichia coli*.....20

2.2.2 *Salmonella typhimurium*.....21

2.3 Bactérias Gram-positivas.....21

2.3.1 *Enterococcus faecalis*.....22

2.3.2 *Staphylococcus aureus*.....23

2.4 Diagnóstico Microbiológico.....24

2.5 Biossensores.....24

2.5.1 Classificação dos Biossensores.....25

2.6 Modificação de superfícies sensoras.....27

2.6.1 Nanopartículas.....27

2.7 Peptídeos Antimicrobianos.....29

2.7.1 Clavanina A.....29

2.8 Métodos Eletroquímicos.....30

2.8.1 Voltametria Cíclica.....31

2.8.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....32

2.9 Análise Morfológica.....35

2.9.1 Microscópio de Força Atômica.....35

3. JUSTIFICATIVA.....38

4. OBJETIVOS.....39

4.1 Objetivo Geral.....39

4.2 Objetivos Específicos.....39

5. MATERIAIS E MÉTODOS.....40

5.1 Materiais.....40

5.2 Equipamentos.....40

5.3 Síntese das AuNPs e sua modificação química.....40

5.4 Culturas dos microorganismos.....41

5.5 Modificação da superfície do eletrodo.....41

5.6 Medidas Eletroquímicas.....42

5.7 Simulação do circuito elétrico equivalente.....43

5.8 Microscopia de Força Atômica.....43

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....44

6.1 Análise por Microscopia de Força Atômica.....44

6.2 Voltametria Cíclica.....45

6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....48

7. CONCLUSÕES.....57

8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....58

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....59

10. ANEXOS.....67

10.1 ANEXO 1.....67

1. INTRODUÇÃO

Dentre os principais problemas enfrentados na saúde pública podemos destacar as infecções hospitalares e o uso indiscriminado de antibióticos. O Ministério da Saúde define infecção hospitalar como aquela adquirida após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Esse problema tem tomado proporções mundiais. De acordo com o Ministério da saúde a taxa média de infecção hospitalar no Brasil é de cerca de 15%, enquanto que nos EUA e na Europa é de 10% (ALMEIDA 2014).

As infecções hospitalares são causadas por diferentes microrganismos como fungos e bactérias. Dentre as bactérias Gram-positivas (BGP) podemos citar o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus sp.* No caso das bactérias Gram-negativas (BGN) destacam-se a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pesudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*. e *Acinetobacter baumannii* (ALMEIDA 2014). Os microrganismos Gram negativos são os mais encontrados em infecções hospitalares, pois possuem uma parede celular complexa e apresentam uma membrana externa à parede celular, a qual atua como uma barreira de permeabilidade (LUZ 2014).

O diagnóstico para infecções bacterianas é baseado nos sinais e sintomas relatados pelo paciente no exame clínico, associados à testes laboratoriais para identificação da morfologia do microrganismo. Os métodos utilizados para identificação bacteriana incluem sua avaliação morfológica e avaliação do seu crescimento. Inicialmente é realizada a Coloração de Gram para classificação da bactéria em Gram positiva ou negativa, em seguida é realizada a cultura do microrganismo (CAMARGO 2001). No entanto essas técnicas demandam muito tempo de análise, desta forma o

desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção de bactérias de forma rápida e sensível é de extrema importância, destacando-se o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos impedimétricos e voltamétricos.

Os biossensores são dispositivos que empregam reações biológicas para o reconhecimento de analitos. Esses dispositivos combinam um componente biológico, o qual interage com um substrato alvo, associado um transdutor físico, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (MONOSIK 2011). Podem ser classificados conforme a camada biológica e o transdutor utilizado. De acordo com a camada biológica podem ser denominados de enzimáticos, imunossensores e celulares. Ademais os transdutores podem ser classificados como: eletroquímicos, ópticos, acústicos e calorimétricos (WANG 2008).

Podemos destacar que a utilização de nanomateriais tem despertado grande interesse no desenvolvimento de biossensores. As nanopartículas (NPs) possuem variedade em sua composição podendo ser compostas por um ou mais componentes orgânicos e/ou inorgânicos. As NPs de metais nobres são atraentes por possuírem versatilidade, simplicidade e propriedades físico-químicas adequadas para aplicações biológicas (ROY 2013). As nanopartículas de ouro (AuNPs) estão sendo bem estudadas devido, principalmente, as propriedades ópticas e facilidade de funcionalização da superfície (COSTA 2012). Em particular, as AuNPs e peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido intensamente investigadas para o desenvolvimento de eletrodos biossensíveis (BELO 2016).

PAMs são moléculas pequenas, catiônicas, anfipáticas e apresentam atividade inibitória contra bactérias, vírus e fungos, sua composição permite uma fácil inserção nas membranas lipídicas sendo possível assim a morte do microrganismo (BELO 2016).

Dentre eles podemos destacar a Clavanina A (ClavA) é um PAM isolado a partir dos hemócitos do tunicado *Styela Clava*, um invertebrado marinho séssil, o qual geralmente é encontrado fixado a superfícies duras. A ClavA destaca-se por apresentar atividade contra BGN (*K. pneumoniae, E. coli*), BGP (*S. aureus* resistente a meticilina) e contra o fungo *Candida albicans* (SAÚDE 2014). Desta forma, o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico para essas infecções de forma rápida e sensível é de extrema importância, destacando-se o uso de AuNPs modificadas com cisteína (Cys) e PAM para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos impedimétricos e voltamétricos.

Na presente dissertação estaremos realizando uma revisão bibliográfica sobre os principais microrganismos causadores de infecções hospitalares, métodos de diagnósticos convencionais e finalmente sobre biossensores como uma alternativa inovadora para o diagnóstico microbiológico. Posteriormente, serão apresentados a justificativa e os objetivos, respectivamente. Os materiais e métodos, resultados e discussão, respectivamente. Finalmente, serão apresentadas as conclusões e perspectivas, sendo seguidos pelas referências bibliográficas como capítulos finais desta dissertação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção Hospitalar

As infecções hospitalares são a principal causa de morte e aumento da morbidade entre pacientes hospitalizados. A incidência de tais infecções é estimada em 5-10% dos pacientes admitidos a hospitais terciários, embora possa alcançar até 28% na unidade de terapia intensiva (UTI) (ALMEIDA 2014). Essas infecções são mais comumente adquiridas como resultado de infecções do trato urinário e do trato respiratório. Em adição infecções do trato urinário podem ser do tipo cruzadas ou endógenas (NAGARJUNA 2015).

A maioria dessas infecções é ocasionada pelo desequilíbrio entre mecanismos de defesa e microbiota humana normal, normalmente isto acontece devido à patologia de base do paciente e procedimentos invasivos realizados sem cuidados adequados. O grupo de patógenos que se destaca na causa dessas infecções são as bactérias denominadas oportunistas, pois elas constituem a flora humana e em indivíduos saudáveis não oferecem risco, no entanto em indivíduos imunocomprometidos podem desencadear uma infecção mais grave. Fungos e vírus também podem ser a causa dessas infecções hospitalares. No entanto, em média dois terços dessas infecções são de origem bacteriana (PEREIRA 2005**).**

Em infecções evitáveis utilizam-se medidas rigorosas de higiene como lavagem de mãos, utilização de Equipamento de proteção individual (EPIs) e observação na assepsia. Por outro lado, as infeções não evitáveis estão relacionadas à baixa imunidade do paciente (NAGARJUNA 2015). Dentre os fatores que influenciam na aquisição das infecções podemos citar: estado imunológico, idade, uso abusivo de antibióticos,

procedimentos médicos invasivos e falhas nos procedimentos de controles das infecções (PEREIRA 2005).

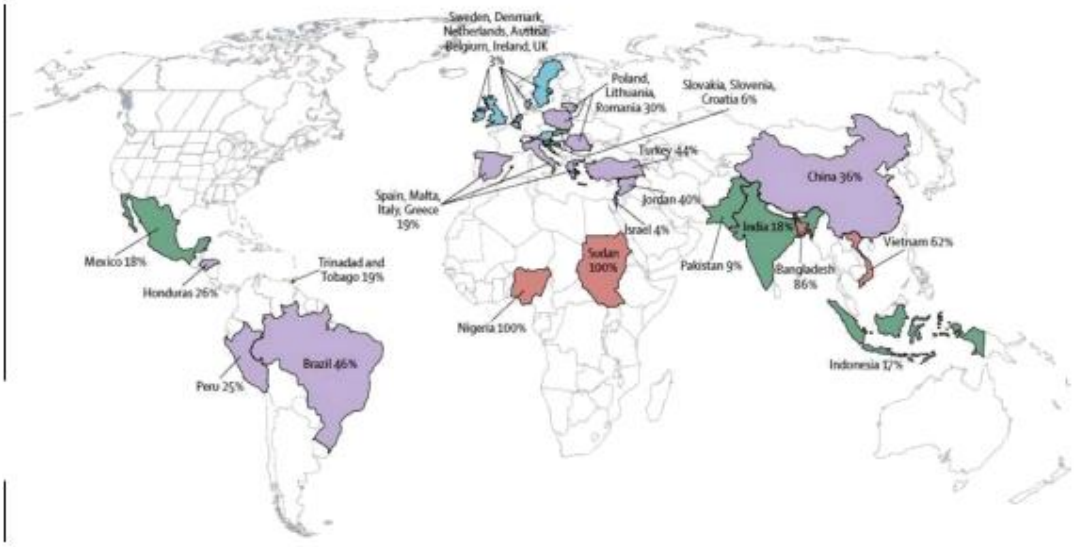

Figura 1 – Porcentagem de uso de antibióticos sem prescrição médica nos diferentes países. São descritas em vermelho as áreas que apresentam mais de 50 % de uso de antibióticos sem prescrição médica, em roxo às que apresentam entre 20 e 50 %, em verde entre 5 e 19 % e em azul àquelas com menos de 5 %.

2.2 Bactérias Gram-Negativas

As BGN são bactérias que não retém o corante violeta de genciana durante o processo na Coloração de Gram (Figura 1). Ademais apresentam uma membrana externa à parede celular, a qual atua como uma barreira de permeabilidade. Sua principal característica é a presença de uma endotoxina denominada lipopolissacarídeo (LPS) que é causadora da patogenicidade e maior responsável por sua virulência (DUCIC 2016). A família *Enterobacteriaceae* possui cerca de cinquenta gêneros e centenas de espécies,

caracteriza-se como o maior e mais diversificado grupo de bacilos Gram-negativos de importância clínica. Essas bactérias fazem parte da microbiota intestinal e são frequentemente isoladas em infecções hospitalares (LUZ 2014).

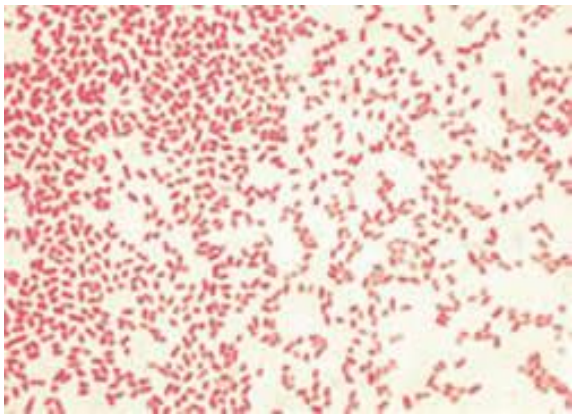

Figura 2 – Microscopia representativa de bacilos Gram-negativos. http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182006000100007&script=sci_arttext

Dentre os microrganismos Gram-negativos causadores de infecções destacam-se *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* e *S. marcescens*. As bactérias causadoras de infecções intestinais são normalmente denominadas de enteropatogênicas e incluem diversas categorias de *E. coli* e sorotipos de salmonela (DUCIC 2016).

2.2.1 Escherichia coli

E. coli é uma BGN que possui forma de bacilo sendo habitat natural é o intestino de seres humanos. *E. coli* é o patógeno mais comum causador de diarreia, septicemia neonatal, infecção do trato urinário e bacteremia. É responsável por 80% das infecções do trato urinário e 30% das infecções hospitalares. A *E. coli* é uma das principais causas de infecções da corrente sanguínea e compreende 17-37% de todas as bactérias isoladas de pacientes com infecções da corrente sanguínea (NAGARJUNA 2015). As infecções da corrente sanguínea com *E. coli* são frequentemente associadas com pacientes que se

submeteram a cirurgias de grande porte, que foram internados em hospitais por longos períodos ou que possuíam um cateter urinário ou periférico (DUCIC 2016).

E. coli na corrente sanguínea pode desencadear resposta inflamatória vigorosa do hospedeiro, conduzindo a sepse associada com alta morbidade e mortalidade. Procedimentos diagnósticos modernos, como biópsias, endoscopias, cateterismo, intubação / ventilação e procedimentos cirúrgicos aumentam o risco de infecção por microrganismos como *E. coli* que são normalmente inofensivas, mas podem tornar-se patogênicas quando as defesas imunológicas do corpo estão comprometidas (NAGARJUNA 2015).

2.2.2 Salmonella typhimurium

S. typhimurium é uma BGN, em forma de bacilo, flagelada, de rápido crescimento e um patógeno oportunista. Transmitida por alimentos como carne de suínos, aves e seus derivados, é a causa da febre tifoide, caracterizada por febre intermitente, mal-estar, manchas pelo tronco, prisão de ventre ou diarreia (DUCIC 2016).

S. typhimurium é o principal causador responsável por surtos de salmonelose em seres humanos. Portanto é um importante agente patogênico para o ser humano, pois os suínos são portadores naturais de *Salmonella* e pode transferi-los para seres humanos (KREUZERA 2014).

2.3 Bactérias Gram positivas

As BGP obtêm coloração violeta ou azul escura através da técnica de Gram, são capazes de reter o corante violeta devido à grande quantidade de peptidoglicano na sua parede celular, geralmente se apresentam em formato de cocos (Figura 2) (CANTÓNA

2013). Embora a maior proporção de infecções hospitalares seja causada por micro-organismos Gram-negativos, os Gram-positivos continuam sendo um grande problema para pacientes hospitalizados. De acordo com o estudo recentemente publicado pelo Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças, *E. coli* é o patógeno mais importante em infecção hospitalar, possuindo *S. aureus* e *Enterococcus spp*. Em segundo e terceiro lugares, respectivamente (CANTÓNA 2013).

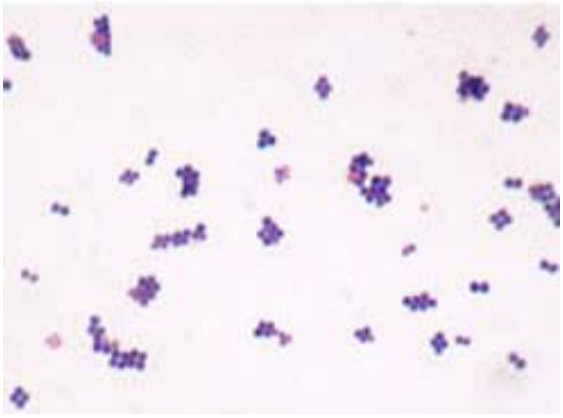

Figura 3 – Microscopia representativa de cocos Gram-positivos. http://www.123rf.com/photo_38627313_gram-stian-was-show-gram-positive-bacilli.html.

2.3.1 Enterococcus faecalis

E. faecalis são cocos Gram positivos, tipo anaeróbio, e fazem parte da flora normal da cavidade oral, do trato gastrointestinal humano e trato genital feminino. *E. faecalis* são causadores de infecções do trato urinário, de feridas cirúrgicas, endocardite e nos últimos anos desenvolveram resistência bacteriana a um nível elevado de agentes antimicrobianos. Possuem inúmeros fatores de virulência, tais como substâncias de agregação, proteínas de superfície e resistência a antibióticos (BOTTCHER 2015).

Enterococcus são reconhecidos como potenciais agentes patogênicos humanos presentes em 12% das infecções hospitalares. Dentre as espécies de Enterococcus, *E. faecalis* é a mais frequentemente isolada nas infecções endodônticas. A presença frequente de *E. faecalis* nos canais radiculares de tratamento, o sugerem como um agente patogênico oportunista. *E. faecalis* tem a capacidade de colonizar e infectar túbulos dentinários, o que dificulta a sua eliminação através de limpeza mecânica e química (NIKLITSCHEK 2015**).**

2.3.2 Staphylococcus aureus

São cocos gram positivos, sendo o *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) considerado um dos principais microrganismos com capacidade de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos. As infecções causadas por *S. aureus* apresentam morbidade e mortalidade elevadas, sendo responsável por 20% das infecções bacterianas humanas e por mais de 30% dos casos de infecções hospitalares, nas quais, os pacientes, funcionários e o próprio ambiente são considerados como potenciais reservatórios (CANTÓNA 2013).

Inicialmente, as infecções causadas por MRSA estavam limitadas aos hospitais, mas nos últimos anos, as infecções associadas ou adquiridas na comunidade passaram a ocorrer de forma crescente, em indivíduos saudáveis e, sem nenhum fator de risco identificável. Por estarem presentes na pele e nasofaringe, torna-se difícil a erradicação de *S. aureus* dos ambientes, principalmente o hospitalar. Desta forma, somente com a prevenção e o controle da transmissão de organismos multirresistentes será possível reduzir os índices de infecções e disseminação (RIBEIRO 2014).

2.4 Diagnóstico Microbiológico

Os métodos convencionais para identificação de bactérias incluem a avaliação morfológica e bioquímica do microrganismo, bem como teste de avaliação do crescimento dos mesmos em vários meios de cultura e em diferentes condições, o que demanda elevado tempo de análise (LIDEROT 2016). Algumas tecnologias mais recentes são muito sensíveis e especificas, mas o tempo de analise continua longo. Por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para amplificar pequenas quantidades de material genético para determinar a presença da bactéria. No entanto, esse método requer pureza da amostra e horas de processamento (WANG 2016).

Em resposta as dificuldades de detecção, vários métodos têm sido propostos para detectar baixas concentrações de patógenos em água, alimentos e amostras biológicas, tais como cromatografia, espectroscopia na região do infravermelho ou de fluorescência, bioluminescência e citometria de fluxo (WANG 2016). No entanto, são técnicas que demandam tempo de análise e preparo adicional da amostra. Desta forma, o desenvolvimento de novas ferramentas para a detecção de bactérias de forma rápida e sensível é de extrema importância, destacando-se o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos impedimétricos e voltamétricos.

2.5 Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo de detecção, contendo um componente biológico ativo diretamente acoplado à superfície de um transdutor, o qual converte um sinal biológico em sinal elétrico, sendo um dispositivo de fácil utilização, rápido, sensível e preciso (Figura 3). Os biossensores permitem que diversos procedimentos alcancem um novo patamar, tornando possível mudanças significativas

na forma de realizar as análises, simplificando o procedimento analítico com resultados seguros e rápidos (CORK 2013).

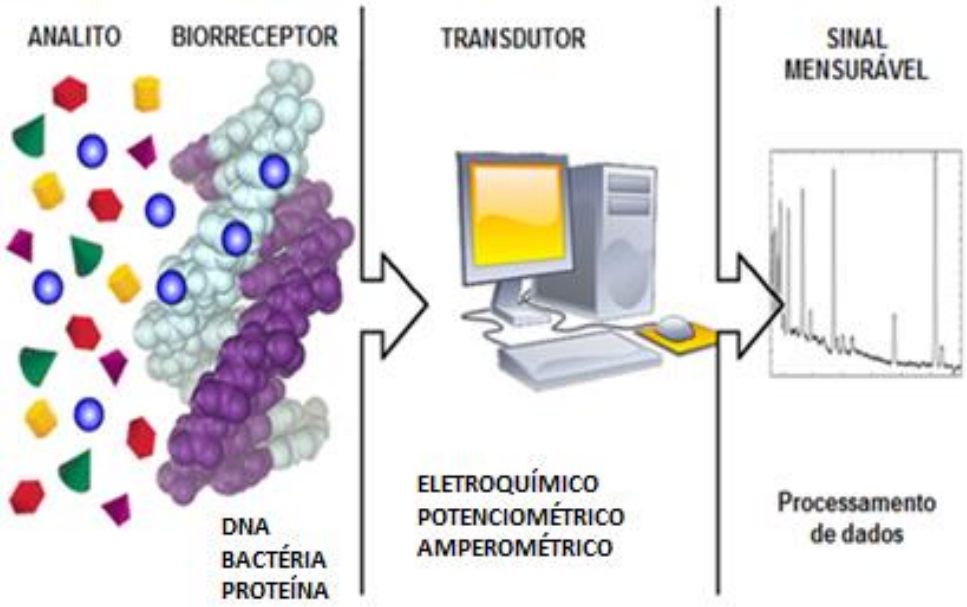

Figura 4 - Esquema geral de um biossensor. O analito é reconhecido pelo biorreceptor e a interação resultante é transformada num sinal elétrico pelo transdutor e registrado através do processamento de dados. Fonte: www.infobibos.com.

2.5.1 Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem ser caracterizados pelo tipo de biomolécula que identificam e pelo tipo de transdutor, como seguem:

Biossensores quanto ao elemento de reconhecimento biológico

Dentre os tipos de sensores que seguem esta classificação podemos destacar os biossensores enzimáticos, celulares, imunossensores, genossensores e aptassensores (CORK 2013).

Os biossensores enzimáticos utilizam enzimas como elementos bioreceptores, como é o caso da glicose oxidase utilizada na mensuração da glicose no sangue. Além do uso da glicose oxidase, várias outras enzimas são utilizadas na construção de biossensores, tais como a urease, penicilinase e álcool desidrogenase (MONOSIK 2012).

Antígenos ou anticorpos podem ser física ou quimicamente estabilizados em superfícies de transdutores, resultando nos sensores denominados de imunossensores. Desta forma, diversos tipos de sensores podem ser obtidos a partir desta reação imunológica (RICCARDI, 2002).

Microrganismos são utilizados para o monitoramento ambiental de poluentes, o qual é feito através de biossensores. Acopla-se a superfície de um eletrodo células através do mesmo princípio de acoplamento utilizado em biossensores enzimáticos. Ademais, apresentam custo reduzido, maior atividade catalítica e estabilidade (SADIK 2009).

Os genossensores são biossensores eletroquímicos destinados a detecção de DNA ou RNA são baseados na hibridação do ácido nucleico (LOWINSOHN 2006). Em adição os biossensores que utilizam aptâmeros (sequências de DNA ou RNA com especificidade a diversas estruturas biológicas) como elemento de bioreconhecimento são denominados de aptasensores (SADIK 2009).

Biossensores quanto ao sistema transdutor

Os biossensores oferecem vantagens como a simplicidade, rapidez na resposta, menor custo, alta sensibilidade e compatibilidade com as tecnologias de micro fabricação de sensores portáteis. Podem ser classificados quanto ao sistema transdutor em eletroquímicos, piezelétricos, ópticos e colorimétricos, os quais serão discutidos a seguir:

1) Eletroquímicos: São baseados em propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade e impedância elétrica (CORK 2013);

2) Piezoelétricos: são baseados nas análises das variações de frequência geradas pelas oscilações de um cristal (SHEN 2006);

3) Ópticos: dentre os biossensores ópticos podemos destacar aqueles baseados nos fenômenos de ondas evanescentes através da ressonância de plasmônica de superfície (do inglês *Surface Plasmon Resonance - SPR*) (TANG 2011);

4) Calorimétricos: são baseados no uso do calor gerado por reações catalisadoras de enzimas exotérmicas para mensurar a concentração do analito (CHAUBEY 2002).

2.6 Modificação de superfícies sensoras

2.6.1 Nanopartículas

A nanotecnologia é o desenvolvimento, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas pelo controle da forma e tamanho dos materiais em escala manométrica (NASCIMENTO 2011). Nanoestruturas e nanodispositivos utilizam-se das propriedades físicas, químicas, elétricas e óticas de novos materiais, os quais podem ser poliméricos, metálicos, cerâmicos e biológicos (PEREIRA 2007). Devido a isso diversos avanços são possíveis, especialmente em se tratando dos materiais nanoestruturados que sofrem alterações químicas e físicas o que permite o aumento da área reativa e da transferência de elétrons na interface sensora (NASCIMENTO 2011). Desta forma, contribuindo para uma maior estabilidade do elemento biológico e quantidade das moléculas imobilizadas, proporcionando assim uma maior eficácia de suas aplicabilidades (SANCHEZ 2010).

As AuNPs (Figura 5) possuem propriedades ópticas, magnéticas e eletrônicas e permitem sua aplicação em diferentes campos como: a construção de biossensores, sistemas de liberação controlada de drogas, células solares, lubrificantes, catálise, entre outras (PEREIRA 2007). Possuem uma dimensão em torno de 15nm e podem ser sintetizadas por métodos químicos e físicos, incluindo a redução do ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) (NASCIMENTO 2011).

Sempionatto e colaboradores desenvolveram um sensor com propriedades inteligentes, baseado em poli-ácido acrílico modificado com AuNps, este sensor demonstrou propriedades que podem discriminar diferentes pHs (SEMPIONATTO 2014). Abbas *et al.* (2015) desenvolveram um sensor eletroquímico utilizando AuNps modificado com pasta de carbono para detecção de Cys, a deficiência de Cys está envolvida em síndromes de crescimento lento em crianças, o sensor demonstrou uma ótima sensibilidade para essa detecção (ABBAS 2015).

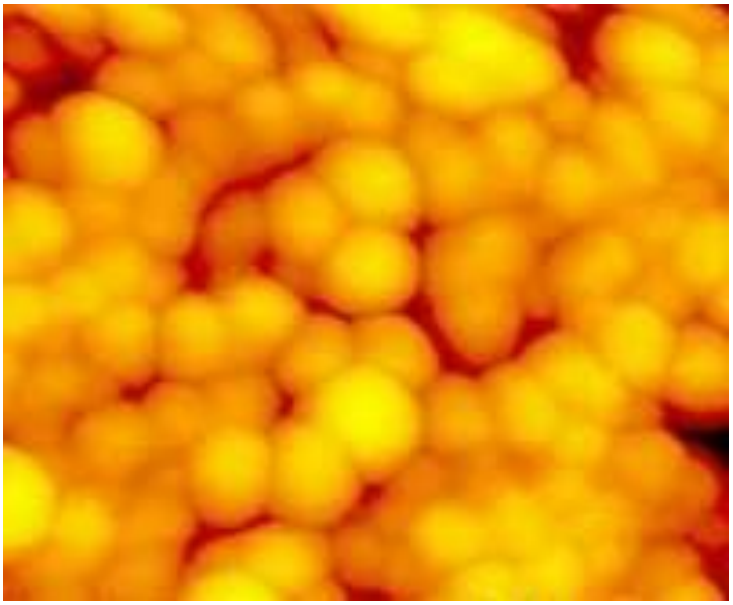

Figura 5 – Microscopia representativa de AuNps.

2.7 Peptídeos Antimicrobianos

PAMs são moléculas pequenas, catiônicas, anfipáticas e apresentam atividade inibitória contra bactérias, vírus e fungos, sua composição permite uma fácil inserção nas membranas lipídicas sendo possível assim a morte do microrganismo. Em virtude da sua capacidade de romper a membrana dos microrganismos, atenção especial tem sido dada aos mesmos (BELLO 2016).

2.7.1 Clavanina A.

A Clavanina A (ClavA) é um PAM isolado a partir dos hemócitos do tunicado *Styela Clava*, um invertebrado marinho séssil, geralmente fixado a corais (Figura 6). Na presença de patógenos o sistema imune da *Styela clava* induz a produção de moléculas bioativas denominadas hemócitos, nos quais a clavanina encontra-se distribuída. Além da ação antimicrobiana a ClavA pode apresentar ação imunoestimulatória (SAÚDE 2012).

Figura 6 – Tunicado *Styela clava*, do qual é extraído ClavA e sua estrutura em alfa-hélice.

A ClavA é composta por uma estrutura alfa-hélice (Figura 6) formada por uma sequência de 23 aminoácidos, apresentando características polares, anfipáticas e catiônicas muito comuns nos PAMs. Esse peptídeo possui atividade otimizada entre pH 5,5 e 7,4 (SAÚDE 2012).

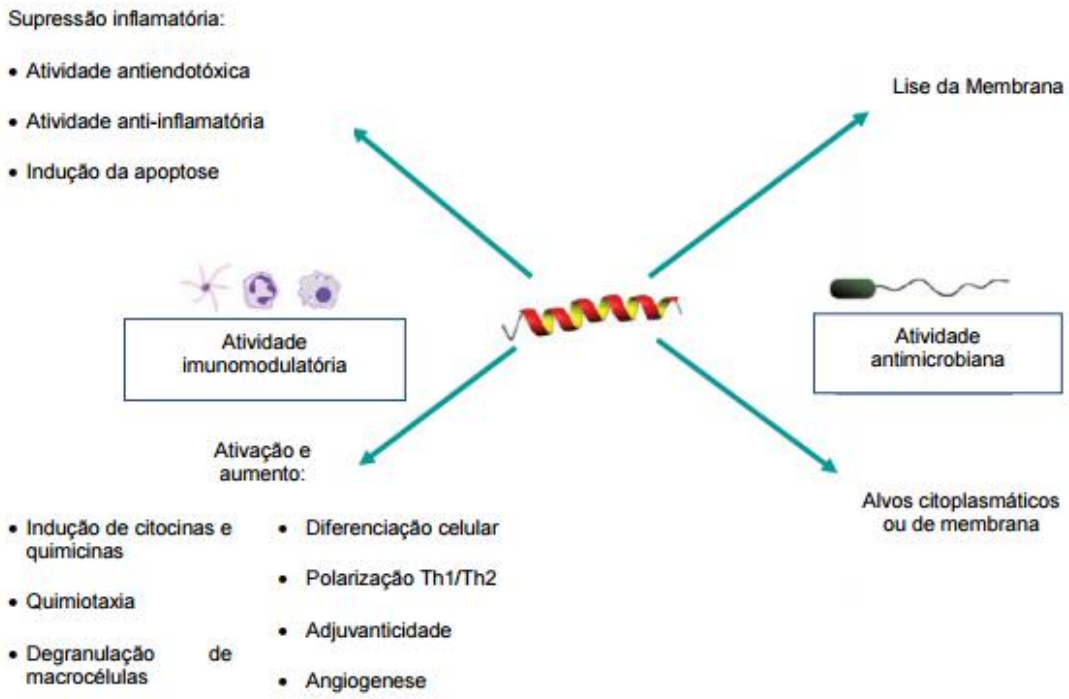

Figura 7 - Múltiplas atividades relacionadas a funções antimicrobianas e imunomodulatórias, apresentadas por diversos PAMs

2.8 Métodos Eletroquímicos

Reações químicas ligadas à transferência de elétrons podem ocorrer de forma homogênea ou heterogênea numa solução ou na superfície de um eletrodo, fazendo parte de uma área da química denominada eletroquímica. Dentro dessa área existem diversas técnicas como: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (BRETT 1993). Tais técnicas são viáveis para desenvolvimento de novas ferramentas

para o diagnóstico microbiológico. Dentre estas, a VC e a EIE foram as de escolha para o desenvolvimento do presente trabalho.

2.8.1 Voltametria Cíclica

A VC é uma técnica onde a variação de corrente durante a aplicação do potencial determina as informações sobre o analito. Durante a VC é gerada uma corrente relacionada a alterações dos eletrodos após aplicação do potencial, que decai rapidamente. Adicionalmente, correntes faradáicas podem ser mensuradas através da transferência de carga de reações redox de espécies eletroativas (BARD 2006). Este processo obedece à lei de Faraday, que determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na interface do eletrodo é proporcional à corrente (LOWINSOHN 2006).

Durante as medidas de VC quando o eletrodo de trabalho é exposto a uma perturbação na forma de onda triangular em função do tempo, o retorno da corrente é mensurado. Desta forma é obtido um gráfico denominado voltamograma cíclico (Figura 7), onde é possível observar a corrente em função da variação do potencial. Correntes de pico catódico (Ipc) e anódico (Ipa) e potenciais de pico catódico (Epc) e anódico (Epa) são os principais itens analisados no voltamograma cíclico (HOLLER 2009). Através do voltamograma cíclico importantes informações sobre a reversibilidade da transferência de elétrons são obtidas. As respostas podem ser reversíveis ou irreversíveis, na resposta reversível as Ipa e Ipc são iguais em valor absoluto, nas respostas irreversíveis observa-se uma completa ausência de picos de oxidação e redução reversos (BARD 2006).

Na caracterização de estudos de modificação da superfície sensora, pode-se utilizar a VC para detalhar importantes informações do sistema, tais como potencial de

oxidação e redução da espécie, número de elétrons transferidos, reversibilidade da reação, coeficiente de difusão, entre outros (BRETT 1993).

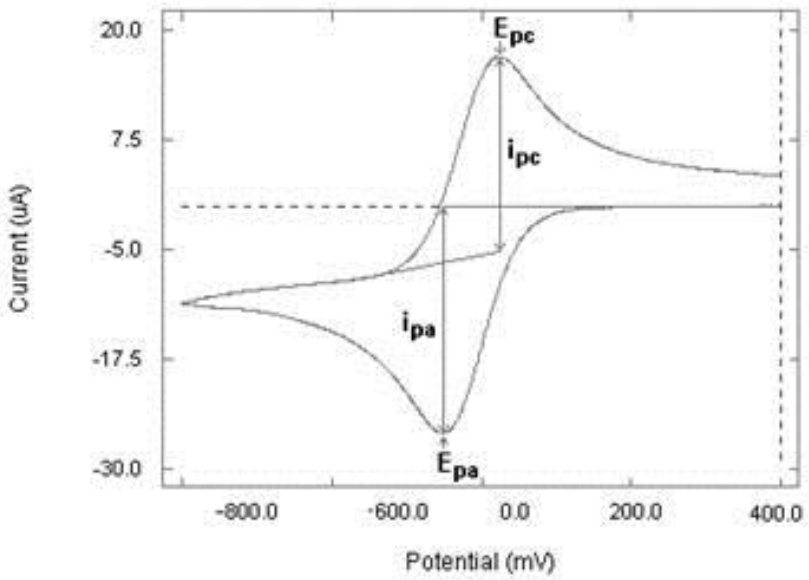

Figura 8 - Voltamograma cíclico. Fonte: http://www.ingenieria.unam.mx/~revistafi/ejemplaresHTML/V15N3/V15N3_art01.php

2.8.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

EIE é uma importante técnica capaz de caracterizar propriedades eletrocinéticas de interfaces de materiais, permitindo o estudo geral do comportamento de processos inter-relacionados que ocorrem em diferentes velocidades. Permitindo uma análise completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução (ZHAO 2015). Sendo assim devido a sua imensa abrangência é possível ser utilizada em diversos estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes

naturezas, ou seja, processos que ocorrem em baterias de íons lítio, células fotovoltaicas, sistemas de corrosão e/ou processos eletrocatalíticos (CARVALHO 2006).

Esse método envolve uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema de estudo que ocorre mediante o uso de um potencial regular (potencial central aplicado) sobre o qual é superposto uma oscilação senoidal de potencial com pequena amplitude (SANTOS 2012). Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio (ZHAO 2015).

A perturbação no sistema é de pequena amplitude, portanto a EIE pode ser utilizada para analisar as etapas de um mecanismo reacional (DAMOS 2004). Capacitância da dupla camada e resistência de polarização podem ser determinadas na mesma medida (SANTOS 2012).

A EIE baseia-se na Lei Ôhmica onde o potencial (U) sobre um condutor metálico, é proporcional, em temperatura constante, ao fluxo elétrico de corrente através do condutor (I).

$$\boldsymbol{R = U/I}$$

A lei ôhmica vale para todas as correntes e potenciais elétricos, a resistência é independente da frequência da corrente. A corrente alternada e o potencial se apresentam em fase. (SANTOS 2007).

Na Figura 9 pode-se observar o circuito de Randles, onde a impedância de Warburg (Z_w) é apresentada. Nele é feita uma previsão onde a corrente faradaica resulta a partir de transferências eletrônicas na interface e esteja associada ao componente capacitivo (C_{dc}). O processo eletroquímico global é representado pelas diferentes

regiões de resposta em função da frequência e pelos componentes do circuito. A resistência da solução eletrolítica (R_e) está associada com a região de alta frequência, já a transferência de carga na interface (R_{CT}) está associada com a região de frequências intermediárias. A constante de tempo é representada pelo produto $R_{CT,}C_{dc}$, onde o efeito de relaxação correspondente é apresentado no plano complexo (Z''- Z') através de um semicírculo de Cole Cole (CARVALHO 2006).

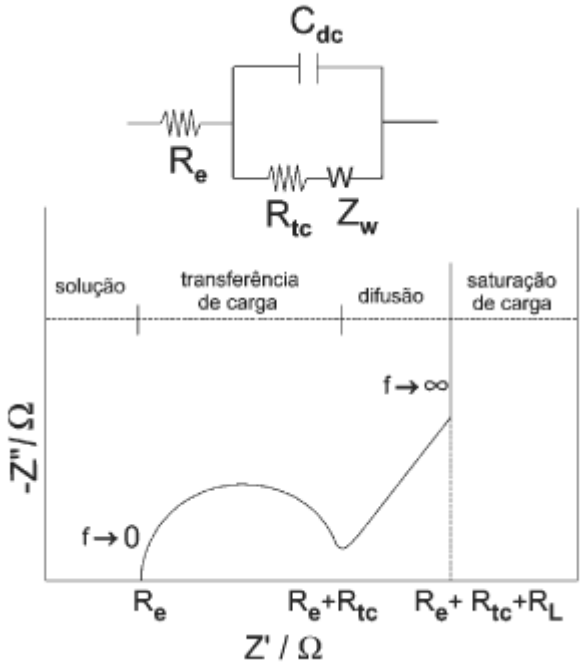

Figura 9 - Circuito do tipo Randles (no topo) e sua resposta idealizada no plano de impedância complexa. Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010040422006000400029&script=sci_arttext

O processo por difusão é caracterizado pelo transporte de massa associado a impedância em baixas frequências. No plano de impedância complexa duas regiões podem ser identificadas: uma região linear em baixas frequências com um ângulo de fase de $\pi/2$, associada com uma resposta puramente capacitiva e uma região linear com ângulo de fase $\pi/4$, correspondendo à difusão semi-infinita e representada pela Z_W. Quando na reação a etapa mais lenta está relacionada ao transporte iônico em direção à

interface, considera-se que a cinética da reação é limitada por difusão (CARVALHO 2006).

2.9 Análise Morfológica

2.9.1 Microscópio de Força Atômica

Baseados na ideia da microscopia de tunelamento (Scanning Tunneling Microscopy – STM) Binning, Quate e Gerber inventaram o Scanning Force Microscopy (SFM) também conhecido como microscópio de força atômica (do inglês Atomic Force Microscopy – AFM). Ambas as técnicas e seus diversos modos de operar pertencem ao grupo de microscopias chamadas SPM (Scanning Probe Microscopy - SPMs). SPM é uma técnica baseada na varredura da superfície por uma sonda de dimensão muito pequena a uma distância muito reduzida, proporcionando uma alta resolução na visualização de superfícies em nível atômico, não utilizam lentes para obtenção de imagens e não é preciso fonte de luz, nem um feixe de elétrons. Pode ser utilizada em diferentes naturezas como: polímeros, metais, amostras biológicas e em diferentes meios como: meios líquidos, vácuo, pressão atmosférica (DULINSKAA 2006).

O funcionamento do AFM é baseado no uso de um cantilever flexível com uma ponteira medindo cerca de 100 a 200 μm de comprimento e menos de vinte nanômetros de diâmetro (Figura 10). Para que a resolução seja atômica, a ponta da sonda que é formada pela ponteira e o cantilever flexível precisam terminar em átomos (DULINSKA 2006). A força de interação equivale ao movimento feito pelo cantilever entre a ponta e a superfície da amostra. A técnica de AFM pode ser realizada em três modos distintos como seguem: contato, não-contato e contato intermitente (Figura 11) (ZHU 2016).

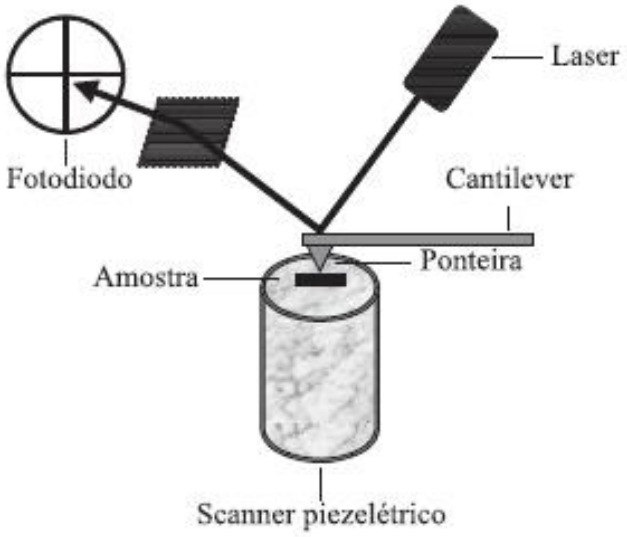

Figura 10 - Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica. Adaptado de Ferreira, 2006.

No modo contato a ponta do cantilever faz um leve contato físico com a amostra, a força interatômica entre essa ponta e a amostra é repulsiva e imagens com alta resolução são produzidas, no entanto a compressão e as forças geradas entre a superfície e a ponta podem danificar a amostra. Amostras biológicas são sensíveis e nem sempre bem aderidas ao substrato, portanto este modo contato é prejudicial para as mesmas (FERREIRA 2006).

No modo não-contato a força interatômica entre a ponta do cantilever e a amostra é atrativa, o cantilever é mantido a centenas de ângstrons da superfície da amostra. A oscilação da ponta ocorre em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), já a força entre a ponta e a amostra é muito baixa, essa oscilação aumenta a sensibilidade do microscópio e detecta forças eletrostáticas. Neste modo de operação a amostra não sofre efeitos de atrito pela ponta (FERREIRA 2006).

O modo contato intermitente ocorre semelhante ao não-contato a única diferença é o fato da ponta vibrante ficar mais próxima da amostra, de forma que haja um contato

intermitente que é utilizado para contornar limitações do modo contato. Neste modo as superfícies são menos modificadas (FERREIRA 2006).

Em geral a principal força associada à técnica de AFM na deflexão do cantilever é a força de van der Walls. As alterações na superfície da amostra são obtidas de acordo com a varredura realizada, esses acidentes são captados no detector, armazenados e processados por um computador e então são transformadas em imagens topográficas (FERREIRA 2006).

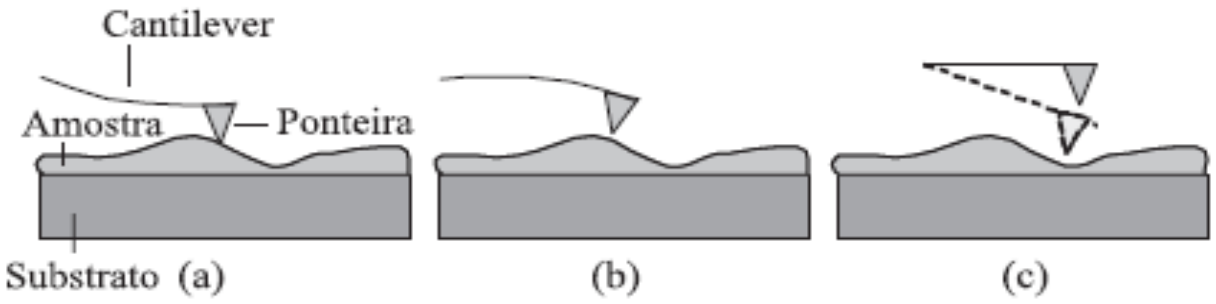

Figura 11 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente. Adaptado de Ferreira, 2006.

3. JUSTIFICATIVA

As infecções bacterianas em seres humanos causam diversos sintomas, dentre os quais podemos destacar a febre, diarreia, vomito, choque séptico e coagulação vascular disseminada. Além disso, um dos principais problemas enfrentados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) vem sendo o uso indiscriminado de antibióticos pela população devido ao diagnostico demorado e/ou impreciso, o qual gera um aumento de resistência das bactérias aos mesmos. Devido ao aumento significativo das mortes causadas por infecções em pacientes, observa-se uma crescente necessidade de desenvolvimento e prototipagem de novos produtos tecnológicos para o diagnóstico preciso de bactérias de forma rápida e eficaz. Neste sentido os peptídeos antimicrobianos têm se mostrado como uma excelente estratégia para o desenvolvimento de sensores para microrganismos. A presente dissertação propõe a modificação da superfície da nanopartículas metálicas com peptídeos antimicrobianos através de métodos químicos para o desenvolvimento de biodispositivos nanoestruturados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Estudar as propriedades eletroquímicas do sistema AuNPsCysClavA visando o desenvolvimento de um biossensor para a identificação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os parâmetros físico-químicos das etapas de modificação da superfície do eletrodo;
- Avaliar as características eletroquímicas das AuNPs modificadas covalentemente por ClavA;
- Estudar os fenômenos interfaciais do sistema AuNPsCysClavA e seu uso para o desenvolvimento de dispositivos nanoestruturados;
- Caracterizar a interação do biossensor frente às bactérias *S. aureus* e *E. faecali*, *S. typhimurium* e *E. coli* através das técnicas eletroquímicas;
- Realizar a avaliação teórica da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) e da resistência à transferência de carga (Zre) utilizando circuitos elétricos equivalentes;
- Avaliar os voltamogramas cíclicos para obtenção das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc);
- Realizar a caracterização dielétrica da interação do biossensor com diferentes tipos de bactérias;
- Utilizar a microscopia de força atômica para análise morfológica da superfície dos eletrodos modificados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

Ácido tetracloroáurico, cisteína, 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Ferri e ferrocianeto de potássio foram obtidos da empresa VETEC (Brasil). As estirpes de bactérias foram cultivadas de acordo com métodos microbiológicos padronizados, utilizando materiais adequadamente esterilizados, soluções e cultura de meio de ágar nutriente. Todos os produtos químicos e solventes foram de grau analítico e utilizados como recebidos, sem purificação adicional. Toda a água utilizada nas experiências foi obtida a partir de um equipamento Milli-Q Plus (Billerica, EUA).

5.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas num Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT128N numa célula convencional de três eletrodos, eletrodo de trabalho modificado com NPsAuCysClavA, eletrodo de ouro como contra eletrodo e eletrodo de referência Ag/ AgCl (KCl saturado) usados durante todo o trabalho. As imagens de microscopia de força atômica, foram obtidas a partir de um AFM/SPM 9700, Shimadzu instruments Co.ltd, Japan.

5.3 Síntese das AuNPs e sua modificação química

Uma solução aquosa de nanopartículas de ouro (1%, p/v) foi preparada pelo procedimento de redução do $HAuCl_4 \bullet H_2O$ com citrato de tri-sódio, o qual atua como estabilizante a uma temperatura de 60°C por 35 minutos. As AuNPs foram modificadas com 10mM Cys por 30 minutos, para obtenção de uma camada estruturada de Cys na superfície da partícula para posterior ligação com o eletrodo modificado.

5.4 Cultura dos microrganismos

Todas as estirpes de bactérias foram cultivadas sob as mesmas condições experimentais, incluindo o tempo de incubação e temperatura. As bactérias foram crescidas em meio de infusão de cérebro coração (caldo BHI) durante 24 horas a 37ºC. Em seguida, para cada uma das espécies consideradas, foi preparada uma suspensão bacteriana concentrada com 10 mL de PBS estéril, resultando numa concentração de cerca de 15×10^8 UFC.mL^{-1}, compatível com a turvação 5 da escala de McFarland. A suspensão bacteriana foi centrifugada durante 10 min a 3000 rpm, posteriormente o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado três vezes com PBS estéril (pH 7,4). Em seguida, utilizou-se solução de formalina em água estéril durante 2 h a 4ºC, homogeneizando o tubo por inversão, para imobilizar as bactérias. Após 2 h de incubação em formaldeído, as bactérias foram lavadas com solução de PBS estéril durante três vezes. Finalmente, a turvação da suspensão bacteriana foi ajustada para 5 da escala de McFarland e estocadas a 4ºC até o uso. As bactérias foram inativadas usando um protocolo adaptado (VAZQUEZ 1996).

5.5 Modificação da superfície do eletrodo

O eletrodo de ouro foi polido com alumina 0,5µm e sonicado por 1 minuto em agua deionizada, e posteriormente seco com nitrogênio (N_2). Em seguida, foi gotejado 2µL de Cys, 2 µL de EDCNHS, 2 µL de AuNPsCys, 2 µL de EDCNHS e 2 µL de ClavA para montagem do sistema AuNPsCysClavA. Após obtenção do eletrodo modificado este sistema foi submetido à incubação de 2 µL das bactérias Gram negativas e positivas. Um diagrama esquemático da montagem do biossensor é apresentado na Figura 11.

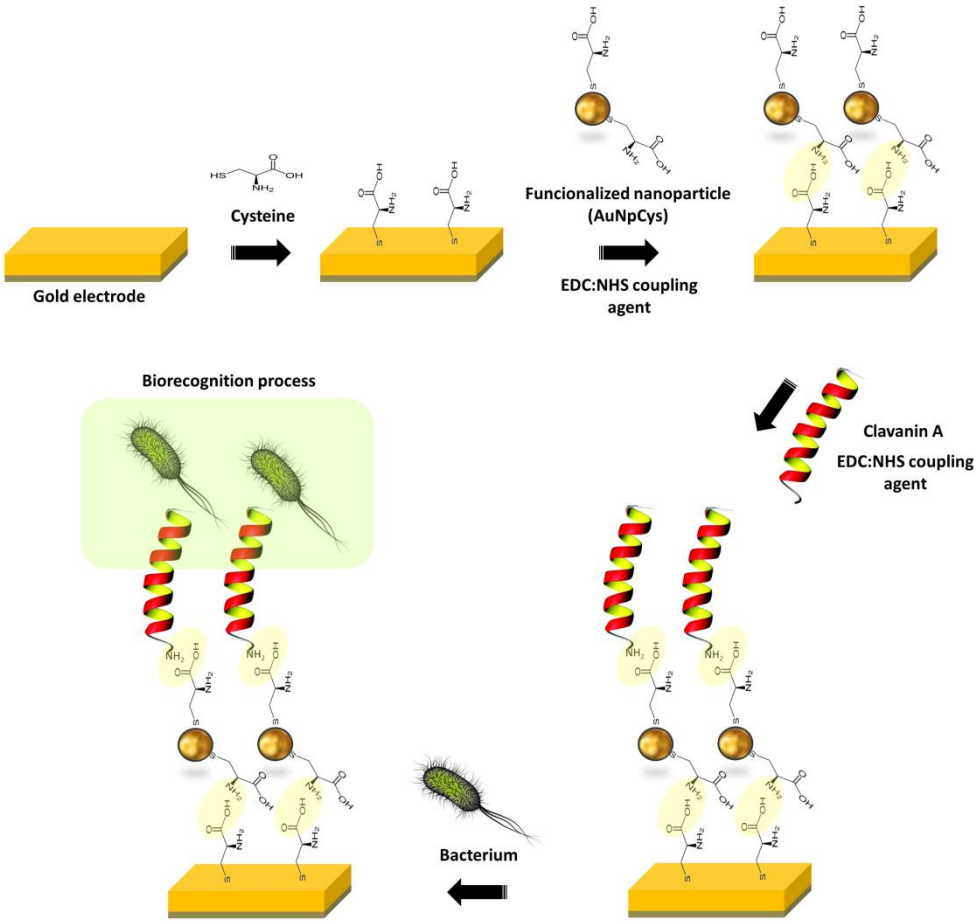

Figura 12 – Representação esquemática da construção do biossensor.

5.6 Medidas eletroquímicas

Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados após cada etapa da montagem do eletrodo na presença de uma solução de 10mM de ferro-ferricianeto de potássio, [K3 (Fe (CN)6)/ K4(Fe(CN)6)] (1:1) como indicador redox em NaCl, a varredura foi de -0,2 a 0,7V com varredura de 50mV/s. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas na mesma solução de ferro-ferricianeto de potássio

numa faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10mV. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente e dentro de uma gaiola de Faraday.

5.7 Simulação do circuito elétrico equivalente

Os diagramas de Nyquist foram submetidos à análise de dados através do programa NOVA, a partir do qual foram obtidas curvas simuladas referentes a cada sistema, com o objetivo de analisar o comportamento interfacial dos sistemas analisados.

5.8 Microscopia de força atômica

As análises topográficas foram realizadas utilizando (AFM/SPM 9700, Shimadzu instruments Co.ltd, Japan). As medidas foram realizadas em modo não contato em temperatura ambiente (cerca de 25ºC). Cantilevers com uma sonda de AFM de silício (nanoworld, Japão, a frequência ressonante = 300 kHz, constante de mola = 42 N.m-1) foram usadas. As imagens (512 pontos por linha) foram coletados com uma taxa de varrimento de 1,0 Hz em uma área de digitalização de 5 × 5 m. Em cada amostra, pelo menos, três áreas foram macroscopicamente separados para análise. O software Gwyddion AFM foi utilizado para analisar as imagens.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização Morfológica

A técnica de AFM foi utilizada para avaliar a modificação da superfície do eletrodo e investigar alterações topográficas (DULINSKAA 2006). Na Fig. 13 observa-se a avaliação durante o processo de fabricação do biossensor, é possível notar mudanças na morfologia da superfície do eletrodo. Um aumento da rugosidade da superfície foi observada após adsorção de AuNPsCysClavA (Fig 13a). A interação entre o sensor e o *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. typhimurium* e *E. coli* pode ser visto nas Figs. 13b, 13c, 13d e 13e, respectivamente. A interação específica com BGN resultou numa alteração perceptível na topografia da superfície com a presença de alguns picos. Assim, indica que o sensor é capaz de reconhecer com sucesso BGN. Por outro lado, não há mudanças significativas no que diz respeito à morfologia da superfície do sensor após interação com BGP (Figs. 13b e 13c). Por conseguinte, os nossos resultados confirmam a especificidade do sensor.

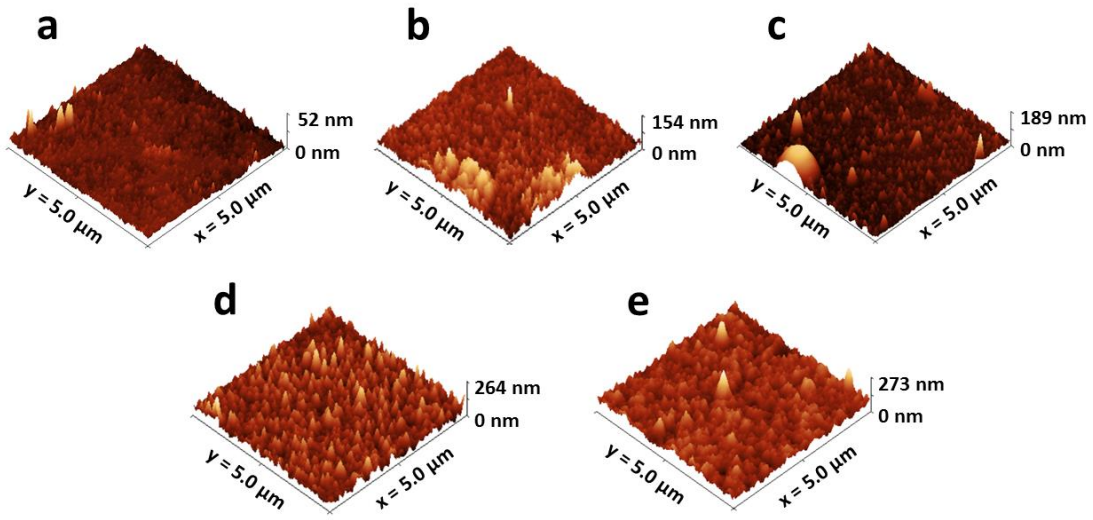

Figura 13 - Imagens representativas do AFM do sistema AuNPsCysClavA (a) e depois as exposição a *S. aureus* (b), *E. faecalis* (c), *S. typhimurium* (d) e *E. coli* (e).

6.2 Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico do eletrodo de ouro foi monitorado a cada passo ao longo da fabricação do biossensor. VC é uma técnica útil para controlar a barreira de transferência de elétrons entre as espécies de solução e a superfície do sensor (BARD 2006). A transferência de elétrons ocorre por um túnel através da barreira ou através dos defeitos na barreira. $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ foi escolhido como par redox, um marcador para investigar as mudanças no comportamento do eletrodo depois de cada passo de montagem (HOLLER 2009). O eletrodo de ouro tem mostrado picos redox bem definidos. O sinal do eletrodo mostra um voltamograma reversível revelando que a reação de transferência de elétrons é principalmente um processo de difusão controlada.

Como esperado, após a modificação da superfície do eletrodo de ouro a cinética de transferência de elétrons é interrompido porque as moléculas imobilizadas devem impedir a penetração da sonda redox $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ formada através da camada (HOLLER 2009). A modificação do eletrodo com Cys induziu um decréscimo na resposta amperométrica. Depois de uma alteração posterior do eletrodo com AuNPsCys e Clava, observou-se uma diminuição das correntes de pico redox e uma redução nas áreas voltamétricas. A resposta voltamétrica das bactérias testadas é mostrada na Fig. 14. Durante o reconhecimento das bactérias foi observado um comportamento quase reversível com uma diminuição considerável nos sinais de oxidação/redução e um aumento na separação entre os picos. É digno de nota que a resposta voltamétrica foi mais significativa para *S. typhimurium* e *E. coli*.

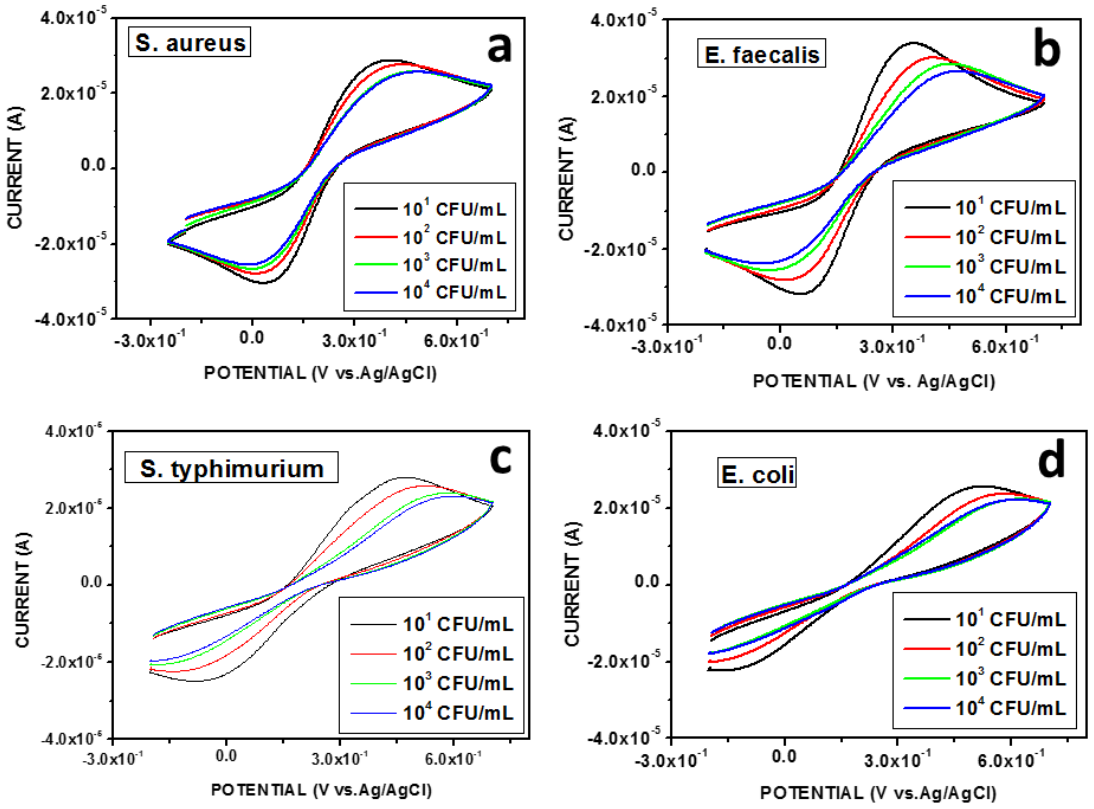

Figura 14 - Voltamograma cíclico do sensor expostos a *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.

Podemos definir o grau de reconhecimento como a porcentagem de desvio relativa da variação da corrente anódica (ΔI) entre as amostras testadas que pode ser calculado de acordo com a seguinte equação: ΔI(%)=[(Ib-Ia)/Ib]×100, onde Ib e Ia corresponde à corrente de pico anódica antes e depois do processo de reconhecimento, respectivamente. Os resultados de ΔI(%) do sensor, antes e após a exposição a diferentes concentrações de bactérias estão apresentadas na Tabela 1. Foi observado um aumento gradual em valores ΔI que se correlacionam com o aumento da concentração de bactérias (Fig. 15).

Eletrodo Modificado	**UFC.mL^{-1}**	**Antes (I_b µA)**	**Depois (I_a µA)**	**ΔI (%)**
AuNPsCysClavA	-	29.87	-	-
S. aureus	10^1	-	22.53	24.57
S. aureus	10^2	-	19.11	36.02
S. aureus	10^3	-	16.14	45.96
S. aureus	10^4	-	15.69	47.47
E. faecalis	10^1	-	24.65	17.47
E. faecalis	10^2	-	18.51	38.03
E. faecalis	10^3	-	14.65	50.95
E. faecalis	10^4	-	11.81	60.46
S. typhimurium	10^1	-	17.85	40.24
S. typhimurium	10^2	-	13.34	55.33
S. typhimurium	10^3	-	8.73	70.77
S. typhimurium	10^4	-	7.61	74.52
E. coli	10^1	-	12.93	56.71
E. coli	10^2	-	8.62	71.14
E. coli	10^3	-	5.84	80.44
E. coli	10^4	-	6.44	78.43

Tabela 1 – Mudança dos picos anódicos do sensor antes e após a interação com bactérias.

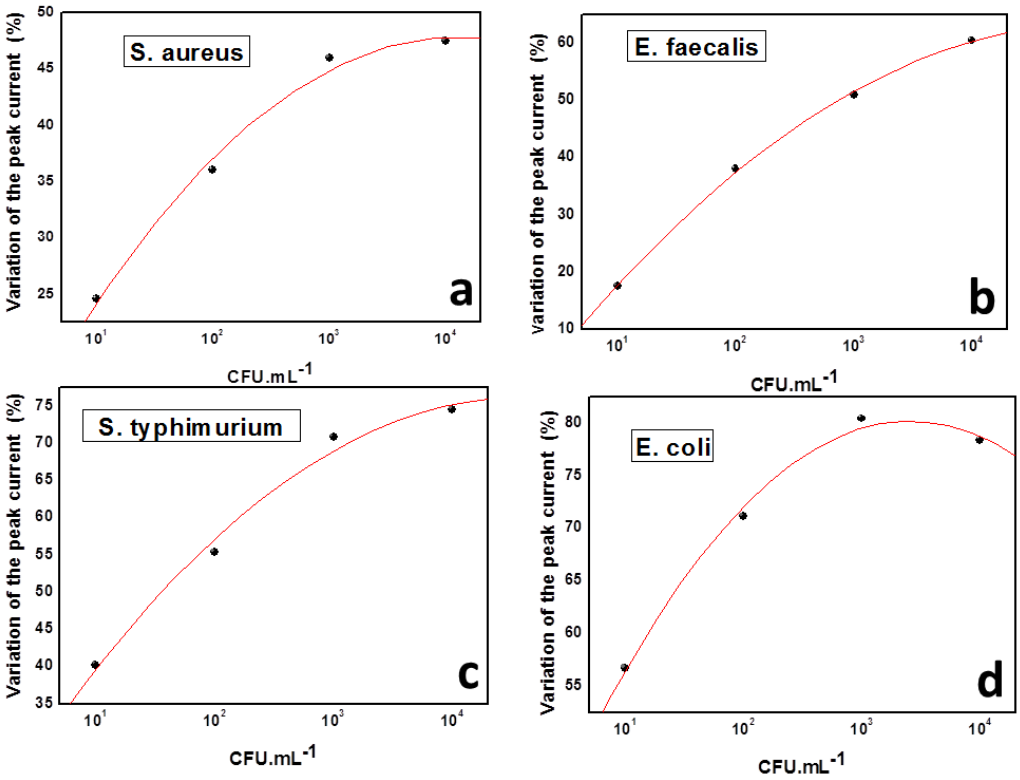

Figura 15 - Variação do pico de corrente anódica do sensor na presença de *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.

6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Diagramas de Nyquist do eletrodo modificado com uma frequência que varia de 100 MHz a 100 kHz são mostrados na Fig. 16. Os dados de impedância foram modelados de acordo com o circuito equivalente de Randles (SANTOS 2012), que inclui a resistência óhmica da solução (R_e), Warburg elemento de impedância (W), capacitância de dupla camada (C_{dl}) e a resistência de transferência de carga (R_{CT}) (ZHAO 2015). W e R_e representam as propriedades de volume da solução de eletrólito e as características de difusão da sonda redox em solução. Portanto, estes componentes de

impedância são afetados pela modificação da superfície do eletrodo (ZHAO 2015). C_{dl} e R_{CT} estão relacionados com processos microscópicos que ocorrem perto da superfície do eletrodo (SANTOS 2012). De nota, os dois segmentos distintos estão associados a processos de difusão de massa que controlam predominantemente transferência de elétrons. Além disso, o elemento de R_{CT} depende da característica de isolamento na interface eletrodo/eletrólito e, no presente estudo, foi mais pronunciada do que as de outros componentes de impedância. Assim, as mudanças R_{CT} foram utilizadas para detectar as propriedades interfaciais do sensor para todos os procedimentos de montagem (SANTOS 2012).

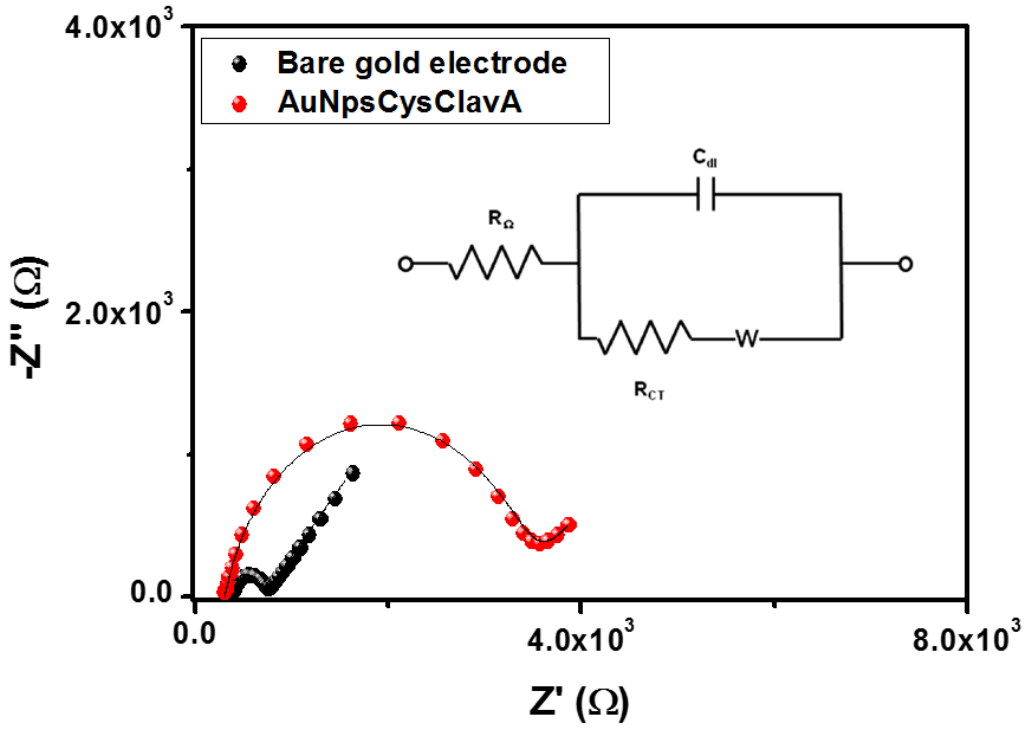

Figura 16 - Diagramas de Nyquist do eletrodo de ouro (●) e AuNPsClavA (●). Inserção: Circuito equivalente de Randles.

Na Fig. 16 é possível observar um diâmetro do semi círculo inferior para o eletrodo de ouro associado a uma característica típica de um processo de transferência de elétrons controlados por difusão em massa. Um aumento gradual na resistência de transferência de carga (R_{CT}) é observado após a modificação da superfície do eletrodo de ouro com Cys (um aminoácido tendo um grupo tiol na sua estrutura química que se liga espontaneamente às superfícies metálicas). A montagem do sistema de CysAuNpsCysClavA na superfície do eletrodo induziu um aumento do R_{CT}, quando comparada com a resposta do eletrodo de ouro, como uma indicação clara do bloqueio na transferência de elétrons.

A interação entre as bactérias e o biossensor resultou em elevados valores do R_{CT}. Após a imobilização de *S. aureus* e *E. faecalis*, o valor de R_{CT} aumentou para 6,49 kΩ e 9,68 kΩ, respectivamente. Os valores mais elevados de R_{CT} foram observados após adsorção de BGN (*S. typhimurium* e *E.coli*). Nosso sensor foi capaz de diferenciar entre BGN e BGP com a resposta mais significativa para a *E. coli*. Este comportamento pode ser atribuído à característica polar do peptídeo (SÁUDE 2014) (Fig. 17).

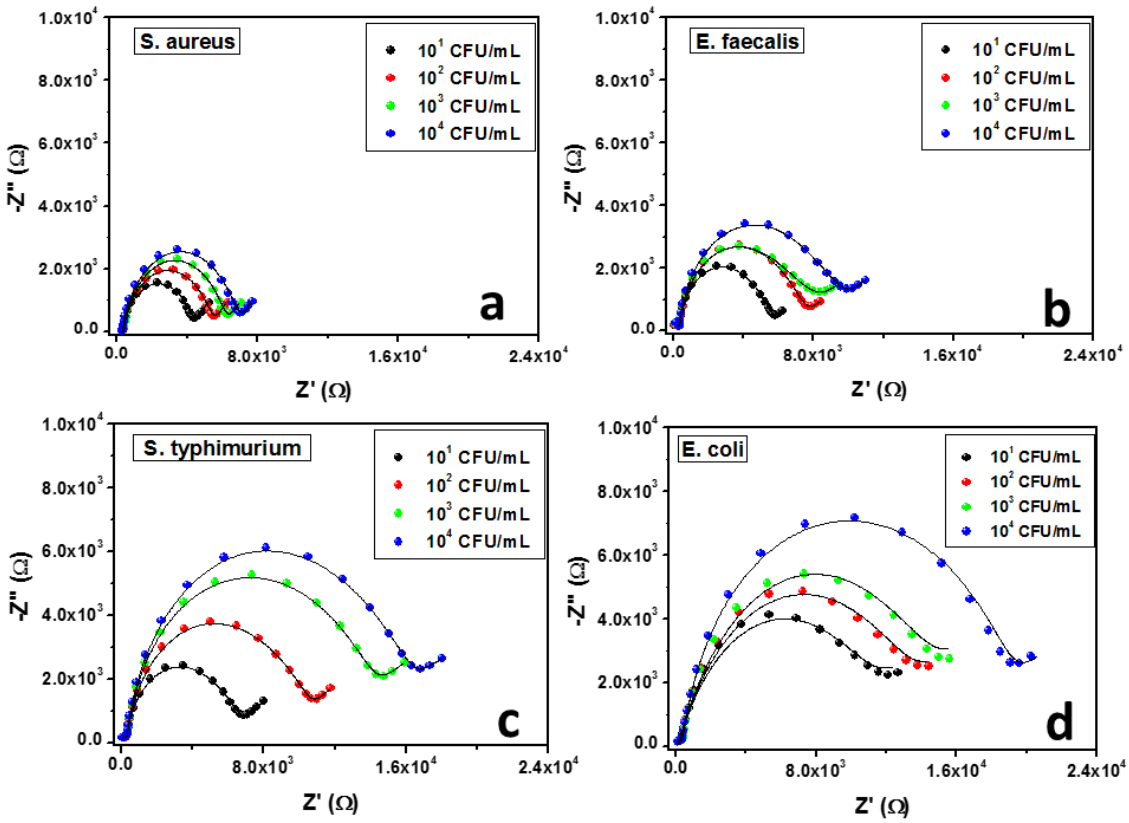

Figura 17 – Diagramas de Nyquist do sensor expostos a *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.

A Tabela 2 mostra os parâmetros do circuito equivalente das curvas de ajuste para todas as medições. Os resultados foram consistentes com as curvas da VC mostradas na Fig. 14 e revelou uma resposta diferente para cada concentração de bactéria avaliada. Após o processo de reconhecimento, os valores de R_{CT} aumentaram significativamente, enquanto que a redução da C_{dl} é observada ao mesmo tempo (ZHAO 2015). Resultados de EIE mostraram um R_{CT} maior para BGN e uma resposta mais baixa para BGP. Portanto, nossos resultados demonstram interações específicas entre ClavA e as diferentes bactérias avaliadas.

Eletrodo Modificado	CFU.mL^{-1}	R_{CT} (kΩ)	C_{dl} (µF)	W (×10^{-4})	ΔR_{CT} (%)
AuNPsCysClavA	-	3.14	2.17	961	-
S. aureus	10^1	3.93	2.06	955	25
S. aureus	10^2	4.99	1.97	979	58
S. aureus	10^3	5.75	1.79	990	83
S. aureus	10^4	6.49	1.84	100	106
E. faecalis	10^1	6.16	2.42	980	96
E. faecalis	10^2	8.23	1.91	676	162
E. faecalis	10^3	8.55	1.64	335	172
E. faecalis	10^4	9.68	1.34	272	208
S. typhimurium	10^1	7.49	2.34	350	138
S. typhimurium	10^2	11.70	1.83	356	272
S. typhimurium	10^3	15.80	1.46	252	403
S. typhimurium	10^4	18.00	1.20	253	473
E. coli	10^1	13.4	2.03	197	326
E. coli	10^2	15.6	1.87	217	396
E. coli	10^3	16.9	1.78	198	438
E. coli	10^4	18.9	1.55	348	501

Tabela 2 - Valores dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância.

Como discutido acima, o aumento gradual do R_{CT} a AuNPsCysClavA, AuNPsCysClavA-*S. aureus*, AuNPsCysClavA-*E. faecalis*, AuNPsCysClavA-*S. typhimurium*, AuNPsCysClavA- *E. coli*, indicam a formação de camadas na superfície do eletrodo de ouro. O valor de C_{dl} depende da constante dielétrica da camada (que separa as cargas iónicas e a superfície do eletrodo), a área de superfície do eletrodo e a espessura da camada de separação (ZHAO 2015). Observou-se uma redução do valor C_{dl} quando o sistema AuNPsCysClavA foi posto em contato com as bactérias. Assim, nota-se que o valor do R_{CT} depende da característica de isolamento na interface eletrodo/eletrólito (CARVALHO 2006).

Os resultados mostram a ocorrência de um valor alto de R_{CT} para o sistema AuNPsCysClavA- *S. typhimurium* e AuNPsCysClavA-*E. coli.* Como descrito na literatura, valores elevados de R_{CT} são normalmente associados com o bloqueio a

superfície do eletrodo (CARVALHO 2006), podemos assumir que a técnica eletroquímica associada com as AuNPsCys e ClavA foram capazes de identificar o processo de interação com as diferentes bactérias. Verificou-se que os valores de R_{CT} aumentam proporcionalmente com a concentração de bactérias. Por outro lado, o valor baixo de R_{CT} obtido para BGP demonstram uma interação baixa, refletindo a especificidade do sistema sensorial utilizado.

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram claramente que ClavA foi capaz de reconhecer as bactérias, como revelado pelo aumento do R_{CT}. O desempenho do sensor para as bactérias foi avaliado através da variação relativa do R_{CT} (ΔR_{CT}). A variação relativa pode ser calculada de acordo com a seguinte equação: $\Delta R_{CT}(\%)=[(R_{CT}CB-R_{CT}C)/R_{CT}C]\times100$, onde $R_{CT}C$ é o valor da resistência de transferência de carga do sensor, $R_{CT}CB$ é o valor de a resistência de transferência de carga do sensor depois de expô-lo a bactérias. Estes resultados são mostrados na Tabela 2.

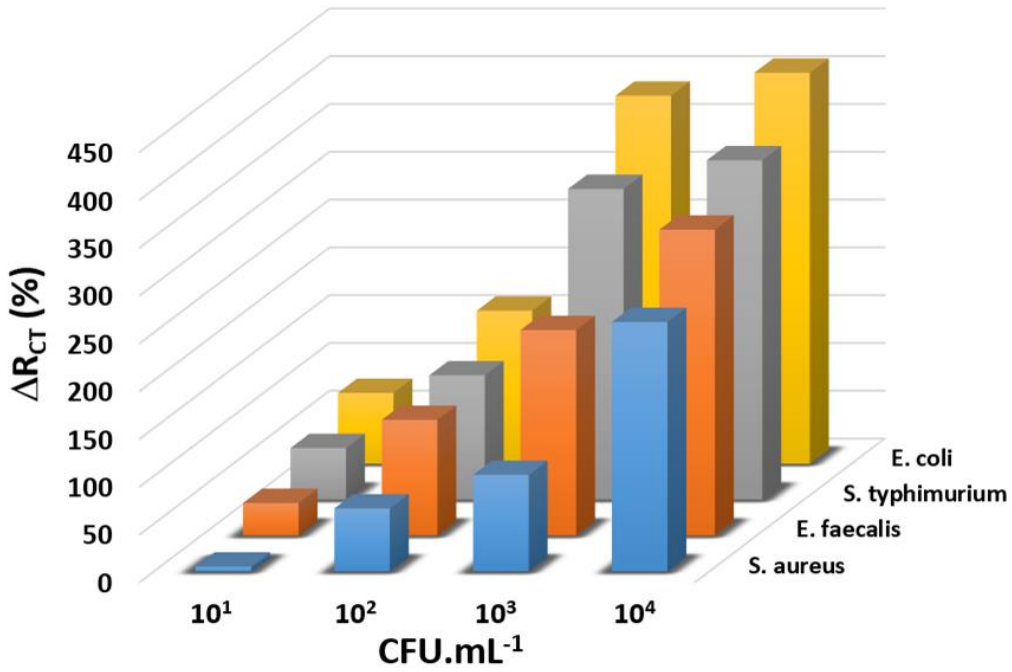

Figura 18 - ΔRCT% do sistema sensor, após a exposição de diferentes concentrações das bactérias.

Foi realizada uma avaliação em diferentes concentrações de bactérias (Fig. 18). Uma relação linear entre concentração e ΔR_{CT} foi encontrada e o limite de detecção foi estimado como sendo de aproximadamente 10^1 CFU.mL^{-1}. Além disso, o aumento de ΔR_{CT} é proporcional à concentração de bactéria e indica que o sistema proposto pode detectar as interações entre a ClavA e bactérias. Obtivemos respostas significativas quando comparados os valores ΔR_{CT} para *E. coli* (501%), *S. typhimurium* (473%), S. aureus (106%) e *E. faecalis* (208%). Assim, a partir dos resultados acima, acreditamos que o biossensor pode ser aplicado com sucesso para a diferenciação entre BGN e BGP.

O grau de revestimento de superfície (Θ) foi utilizado como um parâmetro para avaliar a bioatividade do sensor, calculado como $\Theta=1-[(R_{CTsensor})/(R_{CTsensor\text{-}bacteria})]$ (onde

$R_{CTsensor}$ é o valor do R_{CT} do sensor , $R_{CTsensor-bacteria}$ é o valor do R_{CT} do sensor após expô-lo a cada bactéria). Valores que permitem a quantificação da porcentagem de cobertura de superfície do sensor após o reconhecimento bioespecífico (ANDRADE 2015). Portanto, Θ fornece informações adicionais e complementares sobre o processo de biotecção. A porcentagem da cobertura da superfície após o reconhecimento bactérias é mostrado na Fig. 19, confirmando a detecção de bactérias.

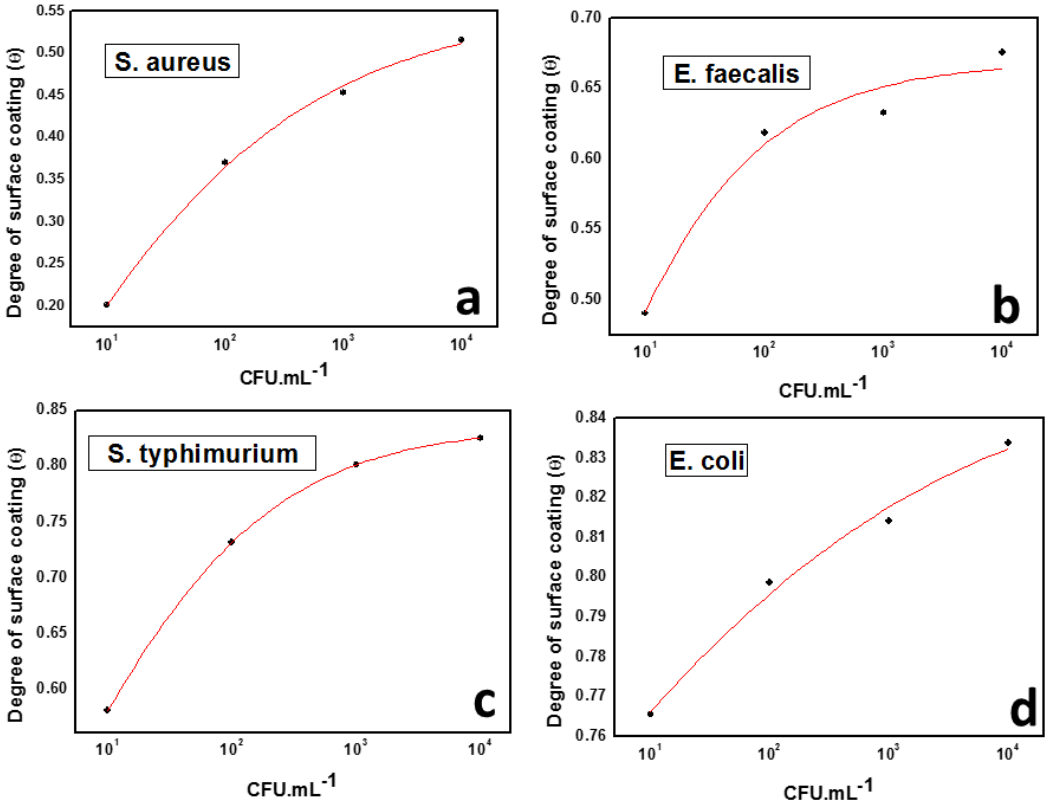

Figura 19 - Grau de revestimento de superfície na presença de *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) e *E. coli* (d), em diferentes concentrações.

Um equilíbrio entre as interações eletrostáticas e hidrofóbicas são associados com a seletividade de PAMs para bactérias. Vale a pena mencionar que estas interações podem fundamentar o mecanismo de ligação à célula bacteriana por PAMs (SAÚDE 2014). As respostas características de BGN e BGP na presença de ClavA são devidos às

diferenças nas estruturas de membrana de bactérias. No caso da estrutura da membrana de BGN é encontrada uma camada fina de peptidoglicano e carregado negativamente de lipopolissacáridos (LPS) na membrana exterior. A parede celular de BGP é composta por ácidos lipoproteícos. Além disso, uma camada fina de peptidoglicano espessura também está presente.

A reprodutibilidade foi avaliada utilizando, pelo menos, três sensores fabricados independentemente, nas mesmas condições. Um R.S.D. de ~ 5,0% foi obtido, o que sugere que o biossensor é reprodutível. Biossensores baseados em ClavA é uma plataforma útil para o desenvolvimento de biossensores para a detecção de bactérias específicas que utilizam pequenas quantidades de amostras.

7. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi demonstrada uma estratégia simples para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para bactérias BGN e BGP baseado em AuNpsCys e ClavA. Os métodos VC e EIE foram aplicados para avaliar a detecção de bactérias, AuNPsCysClavA conseguiu detectar *S. aureus, E. faecalis, S. typhimurium* e *E. coli*, sendo a melhor resposta obtida para *S. typhimurium* e *E. coli*. EIE e VC mostraram que as reações do par redox sobre o eletrodo de ouro modificado foram parcialmente bloqueadas devido à adsorção de AuNPsCysClavA e um bloqueio progressivo foi observado em cada etapa de modificação. O sistema AuNPsCysClavA exibiu uma resposta seletiva para bactérias Gram negativas devido ao comportamento de ClavA que possui característica polar, catiônica e anfipática e desta forma possui melhor interação com as mesmas. O biossensor proposto possui vantagens em relação ao tempo de análise de 15 minutos e necessidade de pequenas quantidades de material biológico.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Desta forma, o presente estudo fornece os insumos necessários para o desenvolvimento de biossensores impedimétricos para bactérias e também informações físiso-químicas sobre o reconhecimento de *S. aureus*, *E. faecalis*. *S. typhimurium* e *E. coli* na superfície sensora. Esse estudo de base serve como orientação para desenvolvimento de novos sensores para bactérias baseado na imobilização de AuNpsCys e ClavA. Nos próximos estudos serão analisadas, outras superfícies sensoras visando baixar o limite de detecção, e aperfeiçoamento da plataforma.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, B.M.M., BREDA, G.L., SILVA, M.G. **Proporção de bactérias multirresistentes de um hospital público sul-brasileiro.** Rev. Med. UFPR 1(1):5-9 Jan/Mar 2014.

Andrade, C.A., et al., **Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection.** Colloids Surf B Biointerfaces, 2015. **135**: p. 833-9.

Antonio Aparecido Pupim Ferreira. Hideko Yamanaka. **Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios.** *Quim. Nova,* Vol. 29, No. 1, 137-142, 2006.

BARD, A.J.; FAULKNER, L.R**. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.** 2ª edição. New York: Ed. Wiley India, 827p, 2006.

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. **Electrochemistry: Principles, Methods and Applications.** New York: Ed. Oxford University Press, 464p, 1993.

CAMARGO, I.B.C., MASCHIETO, A., SALVINO, C., DARINI, A.L.C. **Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário – Uma revisão técnica.** Medicina, Ribeirão Preto, 34: 70-78, jan./mar. 2001.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. **Mediated biosensors**. Biosensors & bioelectronics, v. 17, n. 6-7, p. 441–56, 2002.

COSTA, P.R. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro como ferramenta terapêutica e diagnóstica.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias das radiações, minerais e materiais) - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear.

CORK, J M. REBECCA JONES,J SAWY E. **Low cost, disposable biosensors allow detection of antibodies with results equivalent to ELISA in 15 min.** Journal of Immunological Methods. Volume 387, Issues 1–2, 31 January 2013, Pages 140–146.

Cynthia Rodríguez-Niklitschek, Gonzalo H. Oporto. **Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados:** Revisión de la literatura. Revista Odontológica Mexicana 2015;19 (3): 181-186.

D. Nagarjuna, G. Mittal, R. S. Dhanda, P. K. Verma, , P. K. Verma, R. Gaind and M. Yadav. **Faecal Escherichia coli isolates show potential to cause endogenous infection in patients admitted to the ICU in a tertiary care hospital**. New Microbes and New Infections, Volume 7 Number C, September 2015.

Daiana Elisabeth Bottcher, Nicole T. Sehnem, Francisco Montagner, Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo, Fabiana Soares Grecca. **Evaluation of the Effect of Enterococcus faecalis Biofilm on the 2% Chlorhexidine Substantivity: An In Vitro Study.** JOE — Volume 41, Number 8, August 2015.

DAMOS, F.S., MENDES, R. K., KUBOTA, L.T.. **Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores.** Quím. Nova vol.27 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2004.

Dulinskaa, I., Targosza, M., Strojnyc, W., Lekkab, M., Czubaa, P., Balwierzc, W., Szymonskia, M. **Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy.** J. Biochem. Biophys. Methods 66,1–11, 2006.

Florence Sanchez, Konstantin Sobolev. **Nanotechnology in concrete – A review.** Construction and Building Materials 24 (2010) 2060–2071.

Francisco Claudece Pereira, Maria Valnice Boldrin Zanoni, Ligia Maria Moretto e Paolo Ugo. **Características ópticas e morfológicas de nanoestruturas de ouro.** *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 7, 1550-1554, 2007.

Gianluca Bello, Alice Bodin, M. Jayne Lawrence, David Barlow, A. James Mason, Robert D. Barker, Richard D. Harvey. **The influence of rough lipopolysaccharide structure on molecular interactions with mammalian antimicrobial peptides.** Biochimica et Biophysica Acta 1858 (2016) 197–209.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental.** 6ª edição. São Paulo: Ed. Bookman, p.1056, 2009.

Ilana Farias Ribeiro; Silvia Fernandes Ribeiro da Silva; Sônia Leite da Silva, Thyciana Rodrigues Ribeiro; Márcia Maria Negreiros Pinto Rocha; Ângela Maria Veras Stolp. **Identificação de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina* em estudantes universitários.** Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2014;35(2):299-302.

Juliane R. Sempionatto, Lucas C. Recco and Valber A. Pedrosa. **Polymer Brush Modified Electrode with Switchable Selectivity Triggered by pH Changes Enhanced by Gold Nanoparticles.** *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 25, No. 3, 453-459, 2014.

Jun Wang, Chengtao Sun, Chang Liu, Yujiang Yang, Wenfa Lu. **Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR**. Anaerobe 38 (2016) 1 e 6.

Karin Liderot, Paul Ratcliffe, Petra Lüthje, Ellinor Thidholm, Volkan Ozenci. **Microbiological diagnosis of Eggerthella lenta blood culture isolates in a Swedish tertiary hospital: Rapid identification and antimicrobial susceptibility profile.** Anaerobe 38 (2016) 21e24.

L. Vazquez, L. Jaramillo, R. Lascurain, E.L. Cooper, P. Rosas, E. Zenteno, Comp.Biochem. Phys. B 113 (1996) 355–359.

Liliane A. de Carvalho, Adalgisa R. de Andrade e Paulo R. Bueno. **Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis**. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, 796-804, 2006.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. **Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos**. Química Nova, 29:1318-1325, 2006.

LUZ. D, I. **Heterorresistência e resistência adaptativa à polimixina B em isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de *Kleibsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC).** 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Maria D.L. Oliveira, Cesar A.S. Andrade, Maria T.S. Correia, Luana C.B.B. Coelho, Pankaj R. Singh, Xiangqun Zeng. **Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition.** Journal of Colloid and Interface Science 362 (2011) 194–201.

Miroslav Ducic, Nevena Klisara, Sinisa Markov, Bojan Blagojevic, Ana Vidakovic, Sava Buncic. **The fate and pasteurization-based inactivation of Escherichia coli O157, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in dry, ermented Sausages.** M. Ducic et al. / Food Control 59 (2016) 400 – 406.

Mohammed Nooredeen Abbas, Ayman Ali Saeed, Baljit Singh, Abdellatef A. Radowan and Eithne Dempsey. **A cysteine sensor based on a gold nanoparticle–iron phthalocyanine modified graphite paste electrode.** Anal. Methods, 2015, 7, 2529.

MONOSIK, R.; STREDANSKY, M.; TKAC, J.; STURDIK, E. **Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages Food Anal.** Methods 2012, 5:40–53.

NASCIMENTO. H, P, O. **Biossensor Impedanciométrico baseado em nanocompósitos híbridos de nanopartículas de ouro-polianilina para detecção de sorotipo da dengue em concentração de picomolar.** 2011. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapeutica) – Universidade Federal de Pernambuco.

OLIVEIRA, M. D. L., CORREIA, M. T. S., DINIZ, F. B. **Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biossensor.** Biosensors and Bioelectronics 25 (2009) 728-732.

Rafael Cantóna, Patricia Ruiz-Garbajosa. **Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (Staphylococcus aureus y Enterococcus spp.).** Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31(8):543–551.

René Roy, Tze Chieh Shiao, Kate Rittenhouse-Olson. **Glycodendrimers: versatile tools for nanotechnology.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 49, special issue, 2013.

RICCARDI, C. DOS S.; COSTA, P. I. DA; YAMANAKA, H. **Imunossensor amperométrico.** Quim. Nova, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.

S. Kreuzera, J. Riegerb, E.M. Struckena, N. Thabena, H. Hünigenb, K. Nöcklerc, P. Janczykc, J. Plendlb, Gudrun A. Brockmanna. **Characterization of CD4+ subpopulations and CD25+ cells in ileal lymphatic tissue of weaned piglets infected with Salmonella Typhimurium with or without Enterococus faecium feeding**. S. Kreuzer et al. / Veterinary Immunology and Immunopathology 158 (2014) 143–155.

SADIK, O.A.; ALUOCH, A.O.; ZHOU, A. **Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques.** Biosensors and Bioelectronics, 24: 2749-2765, 2009.

SANTOS, A. R., **Análise por impedância eletroquímica "on-line" de conjuntos eletrodo/ membrana (mea) de células a combustível a membrana polimérica (PEMPC).** Tese programa Tecnologia Nuclear. São Paulo, 2007.

SANTOS, E. S. **Preparação e Caracterização por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica de Biossensores à base da proteína PNA sobre substratos cerâmicos.** Dissertação curso de pós-graduação em nanociências e materiais avançados. Santo André, 2012.

Saude, A.C., et al., ***Clavanin bacterial sepsis control using a novel methacrylate nanocarrier***. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 5055-69.

SHEN, G.; TAN, S.; NIE, H.; SHEN, G.; YU, R. **Electrochemical and piezoelectric quartz crystal detection of antisperm antibody based on protected Au nanoparticles with a mixed monolayer for eliminating nonspecific binding**. Journal of immunological methods, v. 313, n. 1-2, p. 11–9, 2006.

Song Kai, Lu Cheng-Wen, Ding Yi-Nan, Luan Tian, Wang Guang-Ye, Lu Jing-Mei, Guo Li-Quan. **An optical sensing composite for cysteine detection using up-conversion nanoparticles and a rhodamine-derived chemosensor: Construction, characterization, photophysical feature and sensing performance**. / Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 155 (2016) 81–87.

TANG, J., TANG, D., NIESSNER, R., CHEN, G., & KNOPP, D. **Magneto-Controlled Graphene Immunosensing Platform for Simultaneous Multiplexed Electrochemical Immunoassay Using Distinguishable Signal Tags**. Analytical Chemistry, v. 83, n. 13, p. 5407-5414, 2011.

WANG, Y., XU, H., ZHANG, J.,LI, G. **Electrochemical Sensors for Clinic Analysis**. *Sensors* **2008**, *8*, 2043-2081.

Xinyao Zhu, E. Siamantouras, K.K.Liu ,X.Liu. **Determination of work of adhesion of biological cell under AFM bead indentation.** journal of the mechanical behavior of biomedical materials 5 6 (2 0 1 6) 7 7 – 8 678.

Yanlin Zhao, MiWang,. **Experimental study on dielectric relaxation of SiO2 nano-particle suspensions for developing a particle characterization method based on electrical impedance spectroscopy.** Powder Technology 281 (2015) 200–213.

Yuqiong Luo, Zuguang Shen, Pai Liu, Lihong Zhao, Xiaoying Wang. **Facile fabrication and selective detection for cysteine of xylan/Au nanoparticles composite.** Carbohydrate Polymers 140 (2016) 122–128.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1

A SIMPLE NANOSTRUCTURED BIOSENSOR BASED ON CLAVANIN A FOR GRAM-NEGATIVE AND GRAM-POSITIVE BACTERIA DETECTION

Juliana L. de Miranda[1], Maria D.L. Oliveira[1,2], Idjane S. Oliveira[3], Octavio L. Franco[4], Cesar A.S. Andrade[1,2]

[1]*Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

[2]*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.*

[3]*Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.*

[4]*Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil.*

*To whom correspondence should be addressed.

C.A.S, Andrade, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: csrandrade@gmail.com

ABSTRACT

Nosocomial infections are the leading cause of death and increased morbidity among hospitalized patients. The main opportunistic bacteria are *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. In this work, we report the use of Clavanina A (ClavA) peptide and cysteine-modified gold nanoparticles (AuNPsCys) for the development of a biosensor for Gram-negative (BGN) and Gram-positive bacteria (BGP) detection. The stages of electrode modification were evaluated by using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the frequency range of 100 mHz to 100 kHz, through the gradual increase of the charge transfer resistance (R_{CT}) after adsorption of the system components. The higher levels of response were observed for *S. typhimurium* and *E.coli*. In addition, cyclic voltammetry technique (CV) in the scan range -0.2V to 0.7V was also used. Gold electrode shows well-defined anodic and cathodic peak currents. Subsequently, a reduction of peak currents were observed after adsorption of NpsCysClavA composite and being more expressed after adsorption of *S. typhimurium* and *E. coli*. Our results indicate a good sensitivity of the sensor. Thus, the developed system is a viable and simple alternative for bacteria detection.

Keywords: Bacteria, biosensor, impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, gold nanoparticles and antimicrobial peptides.

1. INTRODUCTION

Currently, the development of new methods for bacterial detection is essential in strategical areas such as biodefence, environmental monitoring, food and industry. It is worth mentioning that effective diagnosis allow precise decisions with respect to treatment options, disease diagnosis, food poisoning and water contamination [1]. Gram-negative bacteria (GNB) have a complex cellular wall with an outer membrane that acts as a permeability barrier. Salmonellosis is a widely distributed foodborne diseases. *S. typhimurium* is one of the most important serotypes of salmonellosis and associated to food contamination. In addition, *S. typhimurium* is the cause of typhoid fever characterized by intermittent fever, malaise, stains the trunk, constipation or diarrhea [2, 3]. *E. coli* infection is related to diarrhea, urinary tract infection, bacteremia and neonatal septicemia. In addition, *E. coli* accounts for 80% of urinary tract infections and 30% of nosocomial infections. Diverse procedures such as biopsies, endoscopic, catheterization, intubation/ventilation and surgical procedures increase the risk of infection by microorganisms [4].

It is noteworthy that Gram-positive bacteria (GPB) are also associated to nosocomial infections and remains a major problem for hospitalized patients. *Enterococcus faecalis* can cause a variety of nosocomial infections such as urinary tract infections, surgical wound and endocarditis. In recent years, *E. faecalis* developed to a high level of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Staphylococcus aureus* may cause various infections of the skin and other organs. In addition, *S. aureus* infection is associated to high rates of morbidity and mortality, accounting for 20% of human bacterial infections and over 30% of cases of nosocomial infections [5, 6].

Infections diagnosis are based on signs and symptoms reported by patients during clinical examination. Laboratorial tests for microorganism identification are

based on morphological identification [2]. However, these methods are time-consuming and require specialized technicians. Therefore, the development of new diagnostic tool for rapid and sensitive bacteria detection is extremely required. Of note, electrochemical biosensors have been extensively used as an alternative [5].

Gold nanoparticles (AuNps) are a nanomaterial greatly used in the development of biosensors due to the possibility of surface functionalization and excellent optical and electrical properties [7]. Cysteine (Cys) is an amino acid containing a thiol group and amino groups in its chemical structure, is spontaneously fixed to metal surfaces and has been widely used to functionalize AuNPs [8]. In addition, Cys have been widely used for the immobilization of biomolecules and chemical modification of metal surfaces aimed at the development of biosensors [9, 10]. Recently, Shi et al. developed a genosensor for bacteria based on graphene quantum dots and AuNPs evaluating the response by means of fluorescence resonance energy transfer [11]. In addition, impedimetric antimicrobial peptide-based sensor for the detection of pathogenic bacteria has been developed [12].

Clavanin A (ClavA) is an antimicrobial peptide (AMP) isolated from hemocytes of the tunicate *Styela Clava* (an invertebrate marine sessile that usually is attached to corals). The immune system of the *Styela Clava* is induced to produce bioactive molecules, known as hemocytes, when in contact to pathogens. ClavA is released during immunostimulatory action [13].

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) are analytical techniques used for the development of biosensors. EIS provides information about the electrical behavior of the electrode/solution interface [14] and CV related to redox processes, electron transfer and chemical reactions [15].

In this work, we developed a simple nanostructured biosensor based on cys-modified AuNps on a cys self-assembled monolayer (Fig. 1). After, ClavA was chemically immobilized on cys-modified AuNps to obtain the sensor layer and subsequently evaluate the electrochemical response of *S. aureus, E. faecalis, P. aeruginosa, S. typhimurium* and *E. coli.*

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Tetrachloroauric acid ($HAuCl_4 \cdot H_2O$), cysteine, 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ferri and ferrocyanide potassium were obtained from VETEC (Brazil). Bacterial strains were cultured according to standard microbiological methods using sterilized materials, solutions and culture media nutrient agar. All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received without further purification. All ultrapure water was obtained from a Milli-Q Plus equipment (Billerica, USA).

2.2. Culture of microorganisms

All bacterial strains were grown under the same experimental conditions, including incubation time and temperature. The bacteria were immobilized using a protocol adapted [16]. Bacteria were grown in brain heart infusion (BHI) at 37°C for 24 h. Then, a concentrated bacterial suspension with 10 mL of sterile PBS was prepared, resulting in a concentration of ~15×10^8 $CFU.mL^{-1}$, and compatible to a 5.0 McFarland turbidity standard. The bacterial suspension was centrifuged for 10 min at 3000 rpm.

Subsequently the supernatant was discarded and the pellet was washed three times with sterile PBS (pH 7.4). Formalin solution 0.4 in sterile water for 2 h to 4ºC was used and the tube homogenized by inversion to immobilize the bacteria. Then, bacteria were washed in sterile PBS solution for three times after incubation in formaldehyde for 2h. Finally, the bacterial suspension was adjusted to tube 5.0 McFarland turbidity standard and stored at 4ºC until use.

2.3. Electrode surface modification

The bare gold electrode (BGE) was polished with 0.5μm alumina, sonicated for 1 min in deionized water and then dried with nitrogen. Aliquots of Cys (2 μL) were dropped on the electrode surface and the carboxylic groups of the cys were activated using 0.4 M EDC-0.1 M NHS for 10 min to convert the terminal carboxylic group to activate the NHS ester. AuNps were synthesized by reduction of $HAuCl_4 \bullet H_2O$ (1%, p/v) with tri-sodium citrate at 60°C for 35 min. Subsequently, AuNps were modified using 10mM cys for 30 min to obtain AuNPsCys. After, 2 μL of AuNPsCys were dropped on the cys-modified electrode for 10 min and then the procedure for activate the NHS ester was repeated. Finally, CysAuNPsCys-modified electrode was immersed in a solution of ClavA (1 $mg.mL^{-1}$). The tests were performed using 2 μL of bacteria solutions containing different concentrations and waiting for 10 min. After, the sensor was washed with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) to remove the nonspecifically bound molecules.

2.4. Electrochemical Measurements

Electrochemical experiments were carried out by using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, The Netherlands). A conventional three-electrode cell

composed by a BGE (working electrode), platinum electrode (counter electrode) and Ag/AgCl saturated with KCl (reference electrode) was used in all experiments. Impedance analyses were performed using a solution of 10mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ (1:1) redox pair solution in 10 mM PBS (pH 7.4). CV experiments were performed after each stage of assembly at potential range between +0.7 V and -0.2 V at a scan rate of 50 $mV.s^{-1}$. The frequency range was varied between 100 mHz to 100 kHz with amplitude of the applied sine wave potential of 10 mV. Electrochemical measurements were carried out at room temperature and inside a Faraday cage. Nyquist plots were submitted to analysis of data through EQUIVCRT [17].

2.5. Atomic force microscopy

The topographic analyses were performed using a commercial SPM9700 atomic force microscope (Shimadzu instruments Co.ltd, Japan) in a noncontact mode in air at room temperature (approximately 25ºC). Cantilevers with a silicon AFM probe (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 300 kHz, spring constant = 42 $N.m^{-1}$) were used. The images (512 points per line) were collected with a scan rate of 1.0 Hz in a scan area of 5 × 5 µm. In each sample, at least three areas were macroscopically separated for analysis. The AFM Gwyddion software was used to analyze the images.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Morphological characterization of the biosensor

AFM technique was used to evaluate the electrode surface modification and investigate morphological changes [18, 19]. In Fig. 2 changes in the morphology of the

electrode surface was evaluated during stepwise biosensor fabrication process. An increase in surface roughness was observed after adsorption of AuNPsCysClavA (Fig 2a). The interaction between the sensor and *S. aureus, E. faecalis, S. typhimurium* and *E. coli* can be seen in Figs. 2b, 2c, 2d and 2e, respectively,. The specific interaction with GNB resulted in a noticeable change in the surface topography with the presence of some peaks. Thus, indicating that the sensor can successfully recognize GNB. Conversely, no significant changes with regard to the morphology of the sensor surface after GPB interaction (Figs. 2b and 2c). Therefore, our results confirm the specificity of the sensor.

3.2. Cyclic voltammetry measurements

The electrochemical behavior of electrode was monitored at each step along the sensor fabrication. CV is a useful technique to monitor the electron transfer (ET) barrier between the solution species and sensor surface [20, 21]. ET occurs by tunneling through the barrier or through the defects in the barrier. $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redox pair was chosen as a marker to investigate the changes in the electrode behavior after each assembly step [21]. The clean BGE has shown a well-defined redox peaks. The signal of the BGE shows a reversible voltammogram revealing that the electron transfer reaction is mainly a diffusion-controlled process.

As expected, after electrode surface modification the ET kinetics of $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ is disrupted because the immobilized molecules should hinder the penetration of the redox probe through the formed layer [20]. The modification of the BGE with cys induced a decrease in the amperometric response. After subsequent modification of the BGE with AuNPsCys and ClavA, we observed a decrease in the redox peak currents and a reduction in the voltammetric areas. Voltammetric response of the tested bacteria

is shown in Fig. 3. During the recognition of the bacteria was observed a quasi-reversible behavior with a considerable decrease in the oxidation/reduction signals and an increase in the separation of the peaks. It is worthy to note that voltammetric response was more significant for *S. typhimurium* and *E. coli*.

We can define the recognition degree as the percentage of relative deviation of the anodic current variation (ΔI) between tested samples that can be calculated according to the following equation: ΔI(%)=[(Ib-Ia)/Ib]×100, where Ib and Ia correspond to the anodic peak current before and after the recognition process, respectively. The results of ΔI (%) of the sensor before and after exposure to different concentrations of bacteria are shown in Table 1. It was observed a gradual increase in ΔI values that correlate with the rise on the bacteria concentration (Fig. 4).

3.3. Electrochemical impedance spectroscopic measurements

Nyquist diagrams of the modified electrode with frequency ranging from 100 mHz to 100 kHz are shown in Fig. 5. The impedance data were modelled according to a Randle's equivalent circuit [22], which includes the ohmic resistance of the solution (R_e), Warburg impedance element (W), double layer capacitance (C_{dl}) and charge transfer resistance (R_{CT}) [23, 24]. W and Re represents the bulk properties of the electrolyte solution and diffusion features of the redox probe in solution. Therefore, these impedance components are not affected by modifications of the electrode surface [25]. Cdl and R_{CT} are related to microscopic processes occurring close to the electrode surface [23]. Of note, both distinct segments are associated to mass diffusion processes that predominantly control electron transfer. In addition, R_{CT} element depends on the insulating feature at the electrode/electrolyte interface and, in the present study, was more pronounced than those in other impedance components. Thus, R_{CT} changes was

used for sensing the interfacial properties of the sensor for all assembly procedures [12, 24].

In Fig. 5 is possible to observe a lower R_{CT} for the BGE associated to a typical feature of an electron transfer process controlled by mass diffusion. A gradual increase in the resistance of charge transfer (R_{CT}) is observed after modification of the gold electrode surface with Cys (an amino acid having thiol group in its chemical structure that spontaneously binds to metal surfaces) [10]. The assembly of CysAuNpsCysClavA system on the electrode surface induced an increase in the R_{CT} when compared to the response of the gold electrode, as a clear indication of the blockage in electron transfer (Fig. 6). An additional increase of the R_{CT} is observed after adsorption of the CysAuNpsCysClavA system on the electrode surface (Fig. 6).

The interaction between bacteria and biosensor resulted in high values of the R_{CT}. After immobilization of *S. aureus* and *E. faecalis*, the value of R_{CT} increased to 6.49 kΩ is 9.68 kΩ, respectively. The highest R_{CT} values were observed after adsorption of GNB (*P. aeruginosa*, *S. typhimurium* and *E. coli*). Our sensor was capable to differentiate between GNB and GPB with the most significant response to *E. coli*. This behavior can be attributed to the polar characteristic of the peptide [13].

Table 2 shows the equivalent circuit parameters of the fitting curves for all measurements. The results were consistent with CV curves shown in Fig. 3 and revealed a different response for each bacteria concentration evaluated. After recognition process, the values of R_{CT} increase significantly, while reduction of C_{dl} is observed at the same time [12]. EIS results showed a higher Ret for GNB and a lower response for GPB. Therefore, our results demonstrate specific interactions between evaluated ClavA and diverse bacteria [16].

As discussed above, the gradual increase of R_{CT} to AuNPsCysClavA, AuNPsCysClavA-*S. aureus*, AuNPsCysClavA-*E. faecalis*, AuNPsCysClavA-*S. typhimurium*, AuNPsCysClavA- *E. coli*. indicates the formation of blocking layers AuNPsCysClavA and bacteria on the gold electrode surface. The value of C_{dl} largely depends on the dielectric constant of the layer (separating the ionic charges and the electrode surface), the electrode surface area and thickness of the separation layer [24, 25]. A reduction in the C_{dl} value was observed when the system was AuNPsCysClavA brought into contact with the bacteria. Therefore, we note that the value of the R_{CT} depends on the isolation characteristic at the electrode / electrolyte interface [16].

The results show the occurrence of a high R_{CT} value for AuNPsCysClavA- *S. typhimurium* system and AuNPsCysClavA-*E. coli.* As described in the literature, high R_{CT} values are usually associated with blocking the electrode surface [8], we can assume that the electrochemical technique associated with the NPsAuCys and ClavA were able to identify the process of interaction with the different bacteria. It was found that the R_{CT} values increase proportionally with bacteria concentration [16]. On the other hand, the low value obtained from the R_{CT} for GPB demonstrate a low interaction, reflecting the specificity of the sensory system used. The impedance experiments for the electrodes are modified according to the results obtained in experiments CV [17].

The results presented in Figure 7 clearly show that ClavA was able to recognize bacteria, as revealed by increased R_{CT}. The performance of the sensor for bacteria was evaluated through the relative variation of R_{CT} (ΔR_{CT}). The relative variation can be calculated according to the following equation: $\Delta R_{CT}(\%)=[(R_{CT}CB-R_{CT}C)/R_{CT}C]\times100$, where $R_{CT}C$ is the value of the charge-transfer resistance of the sensor, $R_{CT}CB$ is the value of the charge-transfer resistance of the sensor after exposing it to bacteria [8, 16]. These results are shown in Table 2.

An evaluation was performed for different concentrations of bacteria (Fig. 7). A linear relationship between concentration and ΔR_{CT} was found and the detection limit was estimated to be approximately 10^1 CFU.mL^{-1}. In addition, ΔR_{CT} increases proportional to the bacterium concentration and indicates that the proposed system can sense the interactions between the ClavA and bacteria. We obtained significant responses when compared ΔR_{CT} values for *E. coli* (501%), *S. typhimurium* (473%), *S. aureus* (106%) and *E. faecalis* (208%). Thus, from the above results, we believe that the biosensor can be successfully applied for differentiation between GNB and GPB.

The degree of surface coating (Θ) was used as a parameter to evaluate the bioactivity of the sensor, calculated as $\Theta=1-[(R_{CTsensor})/(R_{CTsensor-bacterium})]$ (where $R_{CTsensor}$ is the value of the R_{CT} of the sensor, $R_{CTsensor-bacterium}$ is the value of the R_{CT} of the sensor after exposing it to each bacterium). Θ values allows the quantification of the percent coverage of the sensor surface after the biospecific recognition [26]. Therefore, Θ provides additional and complementary information about the biodetection process. The percentage of surface coverage after bacteria recognition is shown in Fig. 8, confirming the bacteria detection.

A balance between electrostatic and hydrophobic interactions are associated to the selectivity of AMPs for bacteria. It is worth mentioning that this interactions that could underlie the mechanism of bacterial cell binding by AMPs [23]. The characteristic responses of GNB and BGP in the presence of ClavA are due to the differences in bacteria membrane structures [13]. In the case of GNB membrane structure are found a thin peptidoglycan layer and negatively charged lipopolysaccharides (LPS) in the outer membrane. The cell wall of BGP is composed of teichoics and lipoteichoics acid. In addition, a thick peptidoglycan layer is also present [22].

The reproducibility was estimated using at least three sensors fabricated independently at the same conditions. An acceptable R.S.D. of ~5.0% was obtained, suggesting that the biosensor is reproducible. ClavA-based biosensor is a useful platform for the development of biosensors for specific bacteria detection using small quantities of samples.

4. CONCLUSIONS

In this paper, we present a simple strategy for the development of an electrochemical biosensor for bacteria detection. CV and EIS methods have been used to evaluate the bacteria detection. AuNpsCysClavA was able to differentiate between Gram-positive and Gram-negative bacteria. A progressive blockage was observed after stepwise process. The AuNpsCysClavA system exhibited a selective response to Gram-negative bacteria. The proposed biosensor require small amounts of biological material. We believe that our results confirm that AuNpsCysClavA based biosensor exhibit the necessary sensibility and specificity to be used in the development of new alternatives for microbiological diagnosis.

Acknowledgements

The authors are grateful for support from the Rede de Nanobiotecnologia/CAPES, INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica), CNPq (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9) and FACEPE. de Miranda would like to thank FACEPE for a scholarship.

5. REFERENCES

1. Yang, H., et al., *Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2016. **229**: p. 297-304.
2. Ducic, M., et al., *The fate and pasteurization-based inactivation of Escherichia coli O157, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in dry, fermented sausages.* Food Control, 2016. **59**: p. 400-406.
3. Liu, X., et al., *Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria.* Biosens Bioelectron, 2016. **80**: p. 9-16.
4. Nagarjuna, D., et al., *Faecal Escherichia coli isolates show potential to cause endogenous infection in patients admitted to the ICU in a tertiary care hospital.* New Microbes New Infect, 2015. **7**: p. 57-66.
5. Canton, R. and P. Ruiz-Garbajosa, *[Infections caused by multi-resistant Gram-positive bacteria (Staphylococcus aureus and Enterococcus spp.)].* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2013. **31**(8): p. 543-51.
6. Cereda, R.F., et al., *Antimicrobial activity of ceftobiprole against Gram-negative and Gram-positive pathogens: results from INVITA-A-CEFTO Brazilian study.* The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2011. **15**(4): p. 339-348.
7. Bottcher, D.E., et al., *Evaluation of the Effect of Enterococcus faecalis Biofilm on the 2% Chlorhexidine Substantivity: An In Vitro Study.* J Endod, 2015. **41**(8): p. 1364-70.
8. Oliveira, M.D., et al., *Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition.* J Colloid Interface Sci, 2011. **362**(1): p. 194-201.
9. *<s aureus 2014.pdf>.*
10. Cai, C., et al., *Effects of erythromycin on γ-glutamyl cysteine synthetase and interleukin-1β in hyperoxia-exposed lung tissue of premature newborn rats.* Jornal de Pediatria (Versão em Português), 2014. **90**(5): p. 493-499.
11. Shi, J., et al., *A fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor based on graphene quantum dots (GQDs) and gold nanoparticles (AuNPs) for the detection of mecA gene sequence of Staphylococcus aureus.* Biosens Bioelectron, 2015. **67**: p. 595-600.
12. Hoyos-Nogues, M., et al., *Impedimetric antimicrobial peptide-based sensor for the early detection of periodontopathogenic bacteria.* Biosens Bioelectron, 2016. **86**: p. 377-385.
13. Saude, A.C., et al., *Clavanin bacterial sepsis control using a novel methacrylate nanocarrier.* Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 5055-69.
14. Silva, A.L.C.M.d., et al., *SPR Biosensors Based on Gold and Silver Nanoparticle Multilayer Films.* Journal of the Brazilian Chemical Society, 2014.
15. Cork, J., R.M. Jones, and J. Sawyer, *Low cost, disposable biosensors allow detection of antibodies with results equivalent to ELISA in 15 min.* J Immunol Methods, 2013. **387**(1-2): p. 140-6.
16. Andrade, C.A., et al., *Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2015. **135**: p. 833-9.
17. Costa, M.P., et al., *Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor.* J Colloid Interface Sci, 2014. **433**: p. 141-8.
18. Oyarzún, D.P., et al., *Atomic force microscopy (AFM) and 3D confocal microscopy as alternative techniques for the morphological characterization of anodic TiO2 nanoporous layers.* Materials Letters, 2016. **165**: p. 67-70.
19. Zhu, X., et al., *Determination of work of adhesion of biological cell under AFM bead indentation.* J Mech Behav Biomed Mater, 2016. **56**: p. 77-86.

20. Attard, G.A. and A. Brew, *Cyclic voltammetry and oxygen reduction activity of the Pt{110}-(1×1) surface.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 2015. **747**: p. 123-129.
21. Nosek, M., et al., *Cyclic Voltammetry Characterization of Microparticle Monolayers.* Electrochimica Acta, 2014. **133**: p. 241-246.
22. da Silva, J.S., et al., *Impedimetric sensor of bacterial toxins based on mixed (Concanavalin A)/polyaniline films.* Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **117**: p. 549-54.
23. Zhao, Y. and M. Wang, *Experimental study on dielectric relaxation of SiO2 nano-particle suspensions for developing a particle characterization method based on electrical impedance spectroscopy.* Powder Technology, 2015. **281**: p. 200-213.
24. Kashyap, D., et al., *Application of electrochemical impedance spectroscopy in bio-fuel cell characterization: A review.* International Journal of Hydrogen Energy, 2014. **39**(35): p. 20159-20170.
25. Zhang, X., et al., *Direct immobilization of antibodies on a new polymer film for fabricating an electrochemical impedance immunosensor.* Anal Biochem, 2015. **485**: p. 81-5.
26. Luna, D.M.N., et al., *Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers.* Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **220**: p. 565-572.

Table Captions

Table 1. Amperometric anodic shift of the sensor before and after bacteria interaction.

Table 2. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results and relative charge transfer variation.

Table 1. Amperometric anodic shift of the sensor before and after bacteria interaction.

Modified electrode	**CFU.mL^{-1}**	**Before (I_b µA)**	**After (I_a µA)**	**ΔI (%)**
AuNPsCysClavA	-	29.87	-	-
S. aureus	10^1	-	22.53	24.57
S. aureus	10^2	-	19.11	36.02
S. aureus	10^3	-	16.14	45.96
S. aureus	10^4	-	15.69	47.47
E. faecalis	10^1	-	24.65	17.47
E. faecalis	10^2	-	18.51	38.03
E. faecalis	10^3	-	14.65	50.95
E. faecalis	10^4	-	11.81	60.46
S. typhimurium	10^1	-	17.85	40.24
S. typhimurium	10^2	-	13.34	55.33
S. typhimurium	10^3	-	8.73	70.77
S. typhimurium	10^4	-	7.61	74.52
E. coli	10^1	-	12.93	56.71
E. coli	10^2	-	8.62	71.14
E. coli	10^3	-	5.84	80.44
E. coli	10^4	-	6.44	78.43

Table 2. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results and relative charge transfer variation.

Modified electrode	CFU.mL^{-1}	R_{CT} (kΩ)	C_{dl} (µF)	W (×10^{-4})	ΔR_{CT} (%)
AuNPsCysClavA	-	3.14	2.17	961	-
S. aureus	10^1	3.93	2.06	955	25
S. aureus	10^2	4.99	1.97	979	58
S. aureus	10^3	5.75	1.79	990	83
S. aureus	10^4	6.49	1.84	100	106
E. faecalis	10^1	6.16	2.42	980	96
E. faecalis	10^2	8.23	1.91	676	162
E. faecalis	10^3	8.55	1.64	335	172
E. faecalis	10^4	9.68	1.34	272	208
S. typhimurium	10^1	7.49	2.34	350	138
S. typhimurium	10^2	11.70	1.83	356	272
S. typhimurium	10^3	15.80	1.46	252	403
S. typhimurium	10^4	18.00	1.20	253	473
E. coli	10^1	13.4	2.03	197	326
E. coli	10^2	15.6	1.87	217	396
E. coli	10^3	16.9	1.78	198	438
E. coli	10^4	18.9	1.55	348	501

Figure captions

Figure 1. Schematic representation of the fabrication process of the biosensor.

Figure 2. Representative AFM images of the sensor before (a) and after bacteria interaction: *S. aureus* (b), *E. faecalis* (c), *S. typhimurium* (d) and *E. coli* (e).

Figure 3. Cyclic voltammogram of the sensor exposed to *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) and *E. coli* (d) at different concentrations.

Figure 4. Variation of the anodic peak current of the sensor in the presence of *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) and *E. coli* (d) at different concentrations.

Figure 5. Nyquist diagrams of the bare gold electrode (●) and AuNPsCysClavA (●). Inset: Randles equivalent circuit.

Figure 6. Nyquist diagrams of the sensor exposed to *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) and *E. coli* (d) at different concentrations.

Figure 7. $\Delta R_{CT}\%$ of the sensor system after exposure to different bacteria concentrations.

Figure 8. Degree of surface coating in the presence of *S. aureus* (a), *E. faecalis* (b), *S. typhimurium* (c) and *E. coli* (d) at different concentrations.

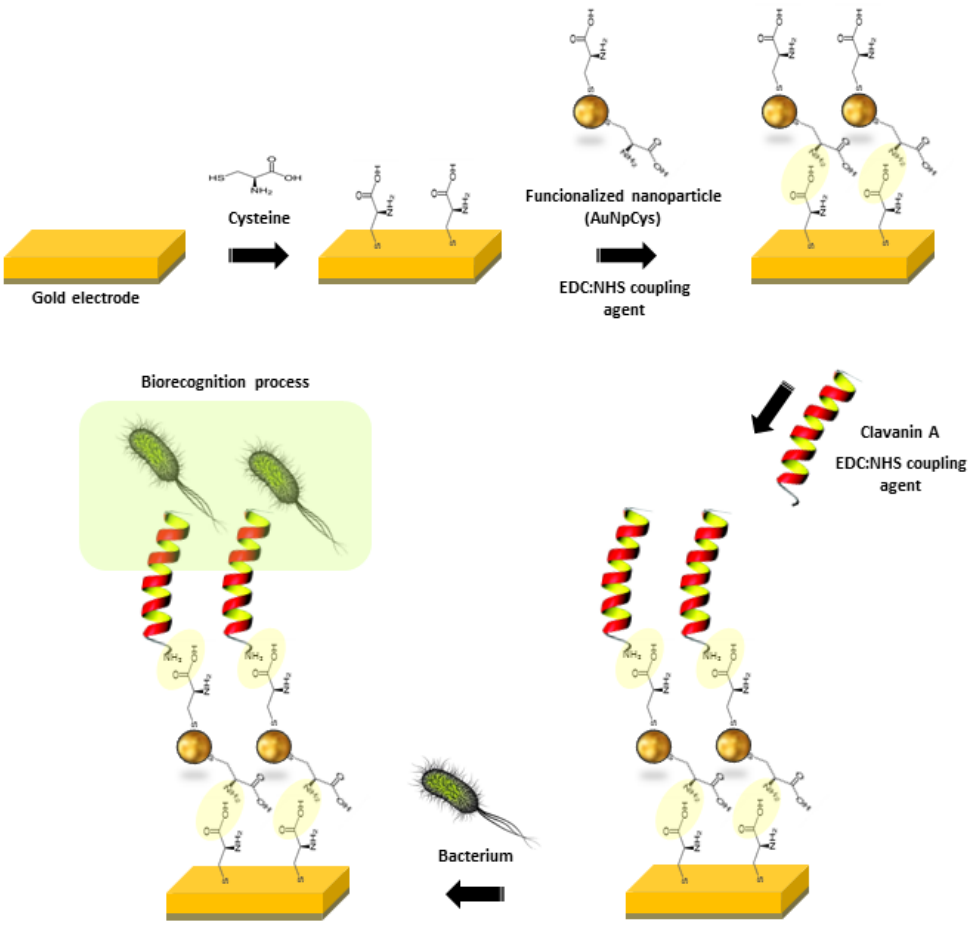
Gold electrode
Cysteine
Funcionalized nanoparticle
(AuNpCys)
EDC:NHS coupling
agent
Biorecognition process
Clavanin A
EDC:NHS coupling
agent
Bacterium

Fig. 1

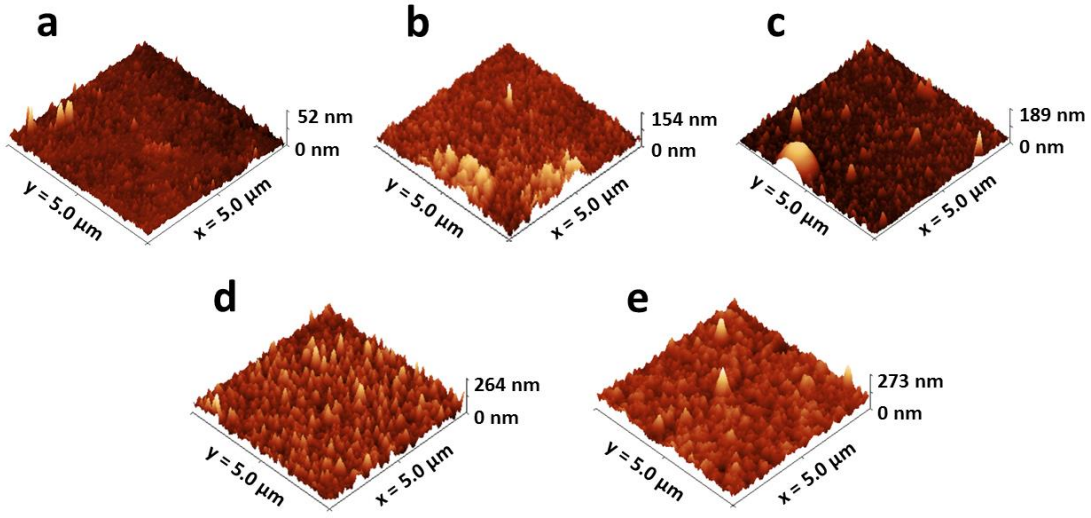
a
52 nm
0 nm
y = 5.0 µm
x = 5.0 µm
b
154 nm
0 nm
y = 5.0 µm
x = 5.0 µm
c
189 nm
0 nm
y = 5.0 µm
x = 5.0 µm
d
264 nm
0 nm
y = 5.0 µm
x = 5.0 µm
e
273 nm
0 nm
y = 5.0 µm
x = 5.0 µm

Fig. 2

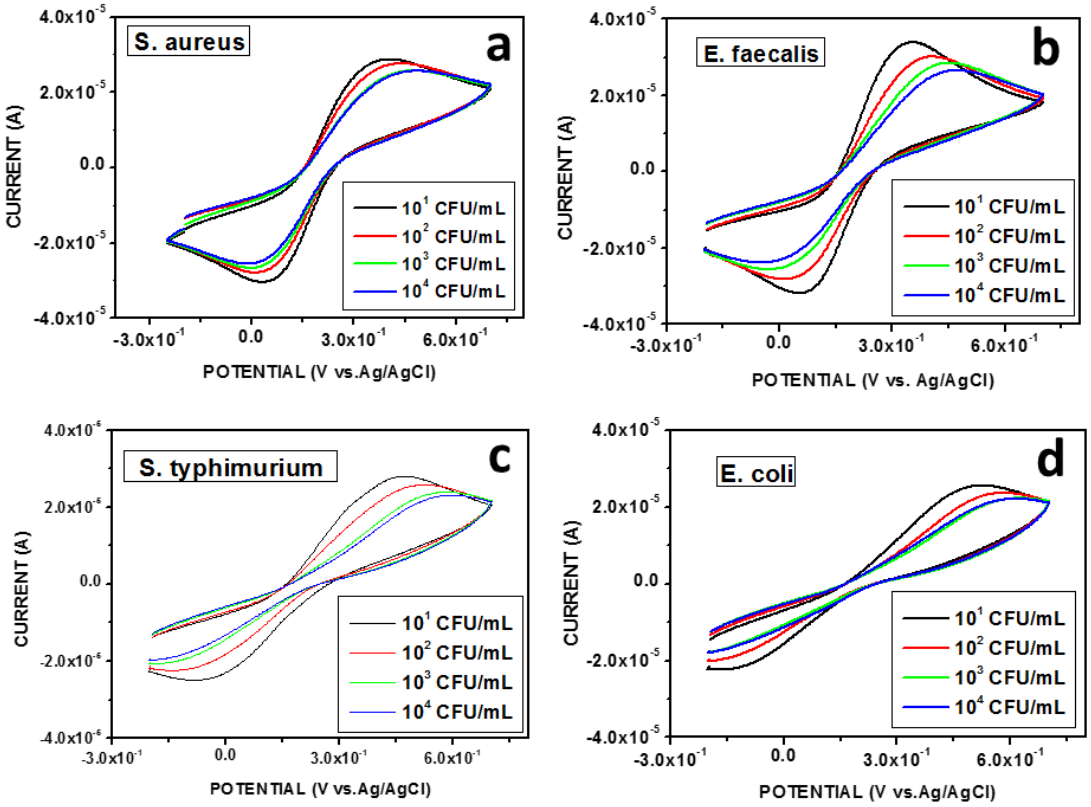
S. aureus
a
E. faecalis
b
S. typhimurium
c
E. coli
d
CURRENT (A)
POTENTIAL (V vs.Ag/AgCl)
POTENTIAL (V vs. Ag/AgCl)
10^1 CFU/mL
10^2 CFU/mL
10^3 CFU/mL
10^4 CFU/mL

Fig. 3

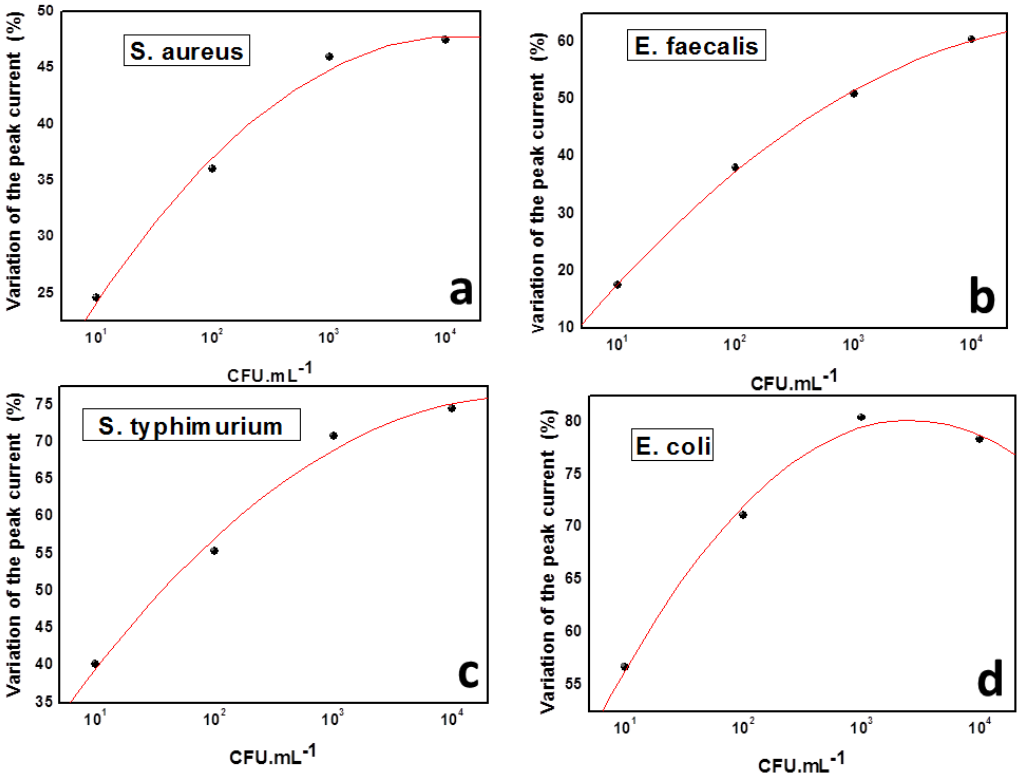
S. aureus
a
Variation of the peak current (%)
CFU.mL-1
E. faecalis
b
Variation of the peak current (%)
CFU.mL-1
S. typhimurium
c
Variation of the peak current (%)
CFU.mL-1
E. coli
d
Variation of the peak current (%)
CFU.mL-1

Fig. 4

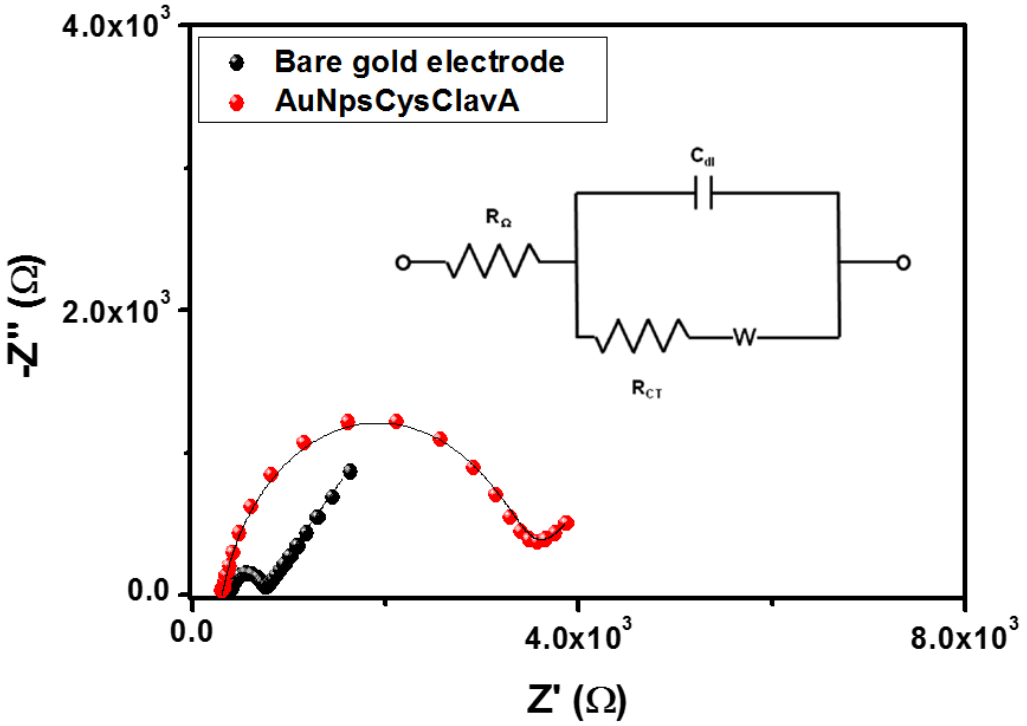
Bare gold electrode
AuNpsCysClavA
C_{dl}
R_Ω
W
R_{CT}
-Z'' (Ω)
Z' (Ω)
0.0
2.0x10^3
4.0x10^3
0.0
4.0x10^3
8.0x10^3

Fig. 5

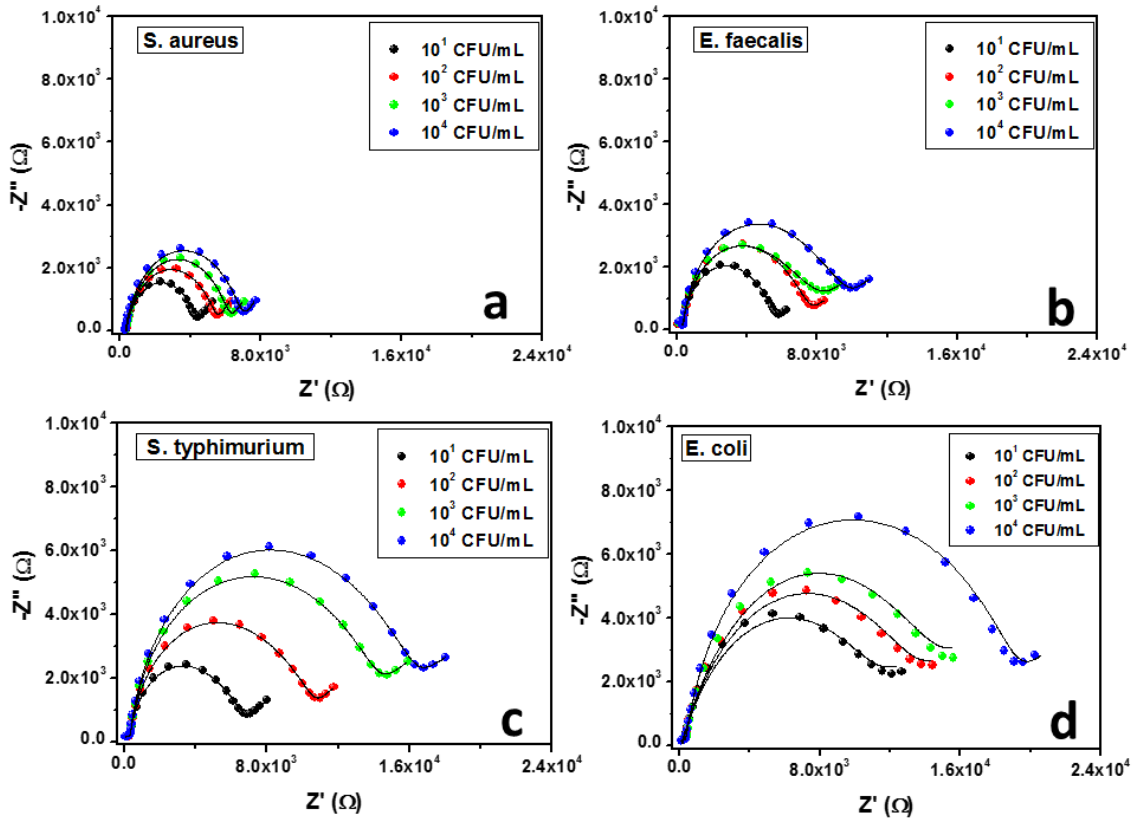
S. aureus
E. faecalis
S. typhimurium
E. coli
10^1 CFU/mL
10^2 CFU/mL
10^3 CFU/mL
10^4 CFU/mL
-Z'' (Ω)
Z' (Ω)
a
b
c
d

Fig. 6

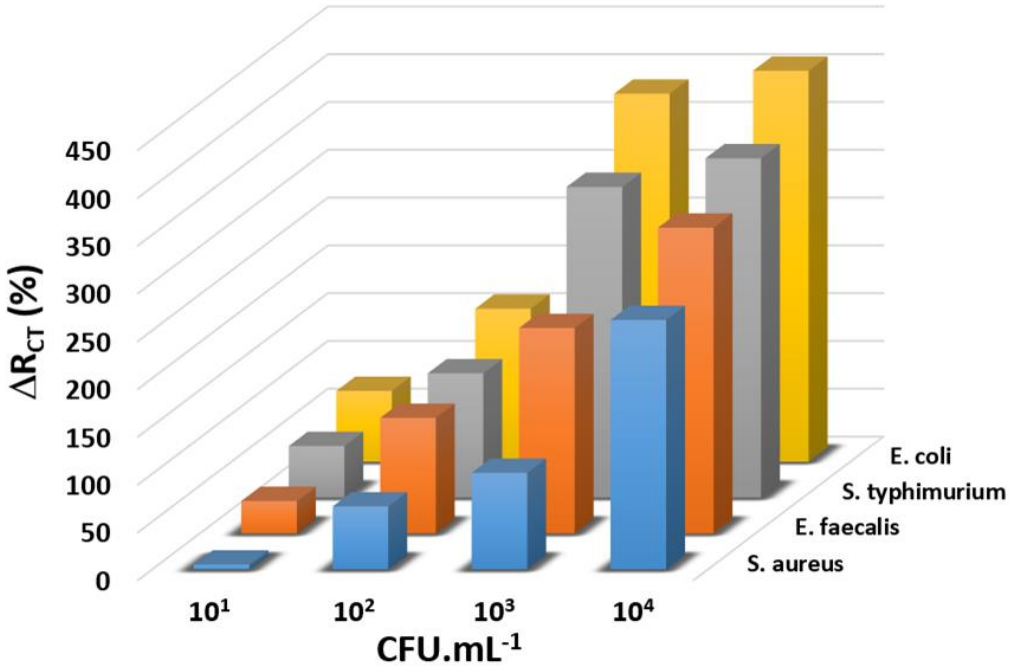
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
ΔRCT (%)
10¹
10²
10³
10⁴
CFU.mL-1
E. coli
S. typhimurium
E. faecalis
S. aureus

Fig. 7

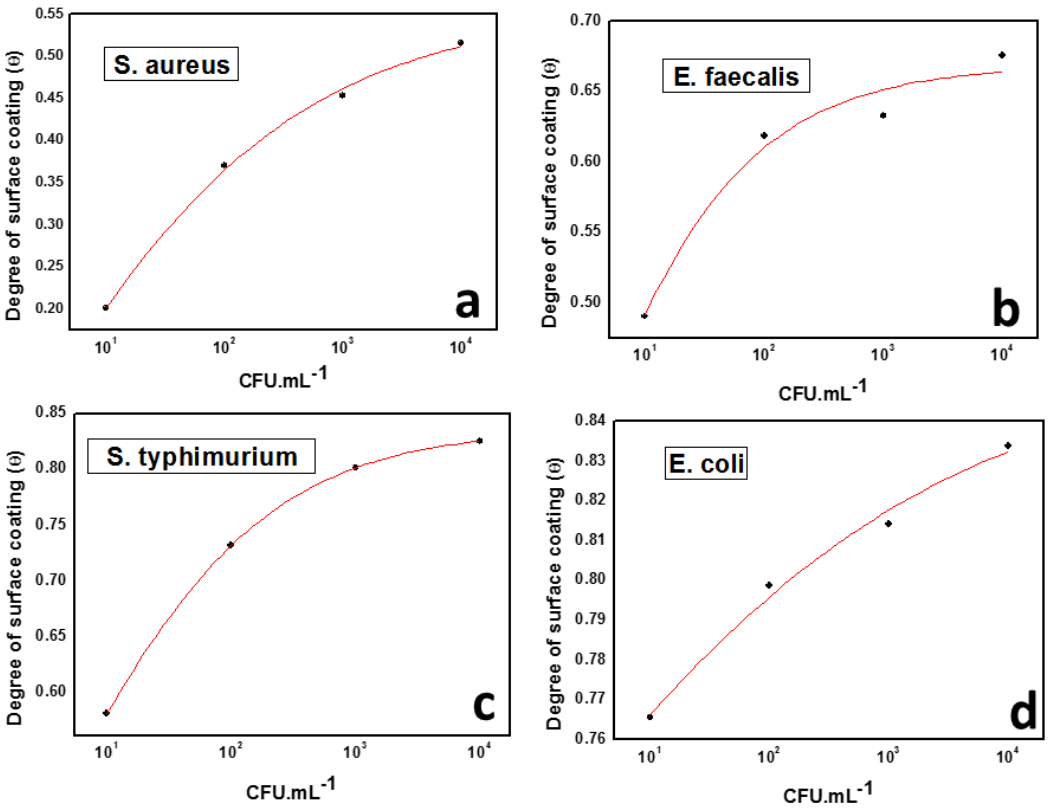
S. aureus
a
E. faecalis
b
S. typhimurium
c
E. coli
d
Degree of surface coating (θ)
CFU.mL-1

Fig. 8