



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

ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO
NANOESTRUTURADO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO E
PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE
INTERESSE CLÍNICO**

Recife

2017

ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO NANOESTRUTURADO
BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO E PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PARA
DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título
de Mestre em Inovação Terapêutica.**

**Área de concentração: Fármacos, medicamentos e insumos
essenciais para a saúde.**

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Recife

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva Júnior, Alberto Galdino da

Desenvolvimento de Biossensor impedimétrico nanoestruturado baseado em nanopartículas de ouro e peptídeo antimicrobiano para detecção de bactérias de interesse clínico / Alberto Galdino da Silva Júnior. – 2017.

145 f. : il.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade. Coorientadora:
Maria Danielly Lima de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2017. Inclui referências.

1. Bactérias 2. Bacteriologia médica 3. Infecção hospitalar I. Andrade, César Augusto Souza de (orient.) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorient.) III. Título.

616.929

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 224

ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO NANOESTRUTURADO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS DE OURO E PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO

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

Aprovada em: 21/07/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica - UFPE

Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - UFPE

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves
Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica - UFPE

Dr. Isaac Aarón Morales Frias
Departamento de Bioquímica – UFPE

A Deus, a quem tudo se resume.

A minha família.

A amigos.

Aos meus livros.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A meus pais Alberto e Marli e irmã Aline, pelo apoio e incentivo aos estudos desde criança.

Aos meus orientadores Prof. Dr. César Andrade e Prof^a Dr.^a Maria Danielly pelo conhecimento passado e pela paciência.

A meus amigos Edilene, Dinho, Poly e Jonne, pela amizade de anos e por tentarem entender um INFJ como eu.

Aos colegas do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados (BioNano) simplesmente por estarem lá e por terem ajudado de alguma forma na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Octávio Franco da Universidade Católica de Brasília pelo fornecimento do peptídeo ClavA, utilizado na plataforma desenvolvida.

Ao Prof. Dr. Celso Melo do Departamento de Física da UFPE por disponibilizar seu laboratório para realização de importantes experimentos.

À Prof^a Dr^a Idjane Oliveira pelo fornecimento das bactérias, ao Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves por disponibilizar seu Laboratório do Departamento de Micologia e a Sandra Regina por preparar as bactérias.

À FACEPE e a CNPq, pelo fomento na pesquisa e bolsa concedida.

Às pessoas que responderam meu bom dia/ boa tarde/ boa noite de forma sincera.

Aos motoristas e cobradores do Rio Doce/CDU por me levarem à UFPE e trazerem pra Rio Doce novamente.

A Deus por ter criado as bactérias, a matéria e elementos químicos, sem os quais não haveria o desenvolvimento do biossensor produzido.

A Deus por ter criado o cinema, Star Wars e a McDonald's

A Deus por ter criado os livros, que me desligam dos problemas e dos humanos (mesma coisa), que me fazem sorrir e me lembram que não pertenço a esse mundo (tantos mundos paralelos e vim nascer logo nesse \rightarrow).

A Deus por ter criado os melhores autores do mundo: Tolkien, George R. R. Martin, J. K. Rowling, Ken Follett, Stephen King, C. S. Lewis, Agatha Christie e Michael Crichton (entre vários outros), que criaram histórias fantásticas e mundos imaginários que seriam melhores para se viver.

A bit of madness is key
To give us color to see
Who knows where it will lead us?
And that's why they need us
So bring on the rebels
The ripples from pebbles
The painters, and poets, and plays
And here's to the fools who dream
Crazy, as they may seem
Here's to the hearts that break
Here's to the mess we make

Audition (The Fools Who Dream) La La Land – Justin Hurwitz, 2016.

RESUMO

O presente trabalho reporta o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado no peptídeo Clavanina A (ClavA). ClavA é um peptídeo antimicrobiano isolado do tunicado marinho *Styela clava*, com capacidade de diferenciar entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A superfície do eletrodo de trabalho foi modificada com monocamadas automontadas de cisteína (Cys) associada a nanopartículas de ouro modificadas com ácido 4-mercatobenzóico e ClavA. Biossensores eletroquímicos dispõem de inúmeras vantagens para o diagnóstico médico devido a sua elevada sensibilidade, especificidade, capacidade, mínimos limites de detecção, miniaturização e pequenas quantidades do analito. A detecção de microrganismos patogênicos é um mercado em ascensão devido ao crescente número de casos de bactérias multirresistentes em países em desenvolvimento. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram usados para avaliar o comportamento eletroquímico do biossensor. Ferri-ferrocianeto foi utilizado como par redox. As bactérias submetidas a identificação pelo biossensor foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. As imagens da microscopia de força atômica revelaram a imobilização da plataforma nanoestruturada na superfície do eletrodo. A resposta eletroquímica diminuiu à medida que a concentração bacteriana se elevava. Foi obtido um limite de detecção entre 10^1 a 10^7 UFC.mL⁻¹. A variação da resposta impedimétrica do biossensor é atribuída à camada de peptidoglicano presente na parede bacteriana. O biossensor nanoestruturado foi capaz de diferenciar entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O biossensor proposto pode ser considerado como alternativa para técnicas de detecção de bactérias.

Palavras-chave: Biossensor. Eletroquímica. Clavanina A. Bactérias. Nanotecnologia.

ABSTRACT

The present work reports the development of an electrochemical biosensor based on Clavanin A (ClavA) peptide. ClavA is an antimicrobial peptide isolated from marine tunicate *Styela clava* and capable to differentiate between Gram-negative and Gram-positive bacteria. The electrode surface was modified with self-assembled monolayers of cysteine (Cys) associated to chemically modified gold nanoparticles with 4-mercaptobenzoic acid and ClavA. Electrochemical biosensors have inherent advantages for medical diagnosis due to their high sensitivity, specificity, low detection limits, miniaturization and small analyte volumes. Pathogenic microorganism detection is a fast-growing market due to the increasing number of cases associated with multiresistant bacteria in developing countries. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were used to evaluate the electrochemical behavior of the biosensor. Ferri-ferrocyanide couple was used as redox pair. The bacteria identification testing was performed using *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Atomic force microscopy images revealed an effective immobilization of the nanostructured platform on the electrode surface. The electrochemical response decreased with increasing bacteria concentration. A detection limit ranging from 10^1 to 10^7 CFU.mL⁻¹ was obtained. The variation in the impedimetric response of the sensor is attributed to the bacterial wall peptidoglycan layer. The nanostructured biosensor was capable to differentiate between Gram-positive and Gram-negative bacteria. The proposed biosensor can be considered as an alternative to bacterial detection techniques.

Keywords: Biosensor. Electrochemistry. Clavanin A. Bacteria. Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática da superfície da parede de bactéria Gram positiva (a) e Gram negativa (b). **28**
- Figura 2** - Microscopia óptica (da técnica de Gram, esquerda) e microscopia eletrônica (direita) das principais bactérias Gram positivas e Gram negativas encontradas em casos de infecção hospitalar. **29**
- Figura 3** - Métodos de diagnóstico presuntivo mais frequentemente utilizados. ELISA (a), PCR (b), meios de cultura sólidos, semissólidos e líquidos (c) e testes rápidos enzimáticos (d). ... **31**
- Figura 4** - Componentes típicos de um biossensor. **33**
- Figura 5** - Célula eletroquímica para determinações potenciométricas. ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência; CE: contra-eletrodo. As setas indicam o fluxo da corrente. (a) Célula de dois eletrodos; (b) Célula de três eletrodos. **36**
- Figura 6** - (a) Interface em que o eletrodo é carregado negativamente; (b) Elementos de circuito elétrico correspondendo à cada componente da interface; (c) Variação do potencial elétrico na interface do eletrodo. ET: eletrodo de trabalho; C_{dl} : capacitância de dupla camada elétrica; R_p : resistência de polarização; Z_w : impedância de Warburg; R_Ω : resistência da solução; CE: contra-eletrodo. **39**
- Figura 7** - Sinal de excitação potencial/tempo aplicado de um ciclo de um experimento de voltametria cíclica. No caso desse exemplo, o potencial inicial, E_i , é de -0,3 V, o potencial do vértice/topo, E_v foi de 0,8 V. **44**
- Figura 8** - Voltamograma cíclico realizado em eletrodo de superfície de ouro de 3 mm de diâmetro em solução redox $Fe(CN)_6^{-3} + e^- = Fe(CN)_6^{-4}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl (3 M KCl). E_{pc} : potencial de pico catódico; E_{pa} : potencial de pico anódico; I_{PC} : corrente de pico catódica; I_{PA} : corrente de pico anódica. **45**
- Figura 9** - Representação do vetor (fasor) da impedância Z mostrando as relações entre o complexo de impedância ($|Z|$), ângulo de fase

	(ϕ) e magnitude. Z_{re} e Z_{im} : eixo real e imaginário da impedância, respectivamente.	48
Figura 10 -	A impedância é um valor complexo, o qual a evolução do tempo de uma onda sinusoidal com determinada voltagem (V) que denota V em uma única frequência e corrente resposta (I), com determinado ângulo de fase (ϕ) que representa a defasagem da corrente em relação ao potencial que foi aplicado.	49
Figura 11 -	Diagrama de Nyquist (a) para o circuito equivalente de Randles (b). Z_w : impedância de Warburg e R_{ct} : resistência à transferência de carga, são acoplados em série para formar a impedância faradaica Z_F	51
Figura 12 -	Representação esquemática da estrutura de uma monocamada automontada em um substrato como a superfície de ouro de um eletrodo.	53
Figura 13 -	Estrutura da cisteína.	56
Figura 14 -	Imagens de soluções de nanopartículas de ouro esféricas (esquerda) e em formas variadas (direita), como função o aumento de seu tamanho ou dimensões, indicado pela variação das cores obtidas da solução coloidal. As escalas em vermelho correspondem a 100 nm.	61
Figura 15 -	Estrutura tridimensional dos principais peptídeos antimicrobianos descritos na literatura.	68
Figura 16 -	Eventos que ocorrem na membrana citoplasmática bacteriana seguida da adsorção do PAM.	71
Figura 17 -	Estrutura tridimensional da clavanina.	75
Figura 18 -	Representação esquemática do sistema sensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA.	78
Figura 19 -	Imagens topográficas obtidas do eletrodo de ouro modificado por Cys (a), Cys_AuNPs-AMB (b), Cys_AuNPs-AMB_ClavA (c), Cys_AuNPs-AMB_ClavA- <i>E. coli</i> (d), Cys_AuNPs-AMB_ClavA- <i>K. pneumoniae</i> (e), Cys_AuNPs-AMB_ClavA- <i>S. typhimurium</i> (f), Cys_AuNPs-AMB_ClavA- <i>E. faecalis</i> (g), Cys_AuNPs-	

- AMB_ClavA-*B. subtilis* (h) e Cys_AuNPs-AMB_ClavA-*S. aureus* (i). **81**
- Figura 20** - Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do processo de modificação de eletrodo pelo sistema Cys_AuNPs-AMB_ClavA: Limpo (■), Cisteína (●), Cys_EDC:NHS (▲), Cys_EDC:NHS_AuNPs-MBA (◆), Cys_EDC:NHS_AuNPs-MBA_EDC:NHS (▼), Cys_EDC:NHS_AuNPs-MBA_EDC:NHS_ClavA (*). **82**
- Figura 21** - Voltamograma cíclico do sistema sensor seguido pela resposta eletroquímica após contato com as bactérias em diferentes concentrações: *E. coli* (a), *K. pneumoniae* (b), *S. typhimurium* (c), *E. faecalis* (d), *B. subtilis* (e) e *S. aureus* (f). Sonda redox: 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) em solução PBS (pH 7,2); taxa de varredura 50 mV s⁻¹. **86**
- Figura 22** - Diagramas de Nyquist do sistema sensor após contato com as bactérias em diferentes concentrações: *E. coli* (a), *E. faecalis* (b), *K. pneumoniae* (c), *B. subtilis* (d), *S. typhimurium* (e) e *S. aureus* (f) **88**
- Figura 23** - Circuito equivalente de Randles usado para obtenção dos valores de impedância. **89**
- Figura 24** - ΔR_{ct} para o sistema sensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA após exposição com as diferentes concentrações de bactéria. O R_{ct} das bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b) usados para obtenção dos dados ΔR_{ct} abaixo estão descritos na Tabela 2. **92**
- Figura 25** - Valores do grau de revestimento superficial (θ) em função da concentração das bactérias (10¹-10⁷ UFC mL⁻¹). Todos dados usados para calcular o θ estão demonstrados na tabela 2. **93**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Lista dos principais PAMs estudados na literatura, local onde o peptídeo é isolado e suas respectivas atividades. Todas ações descritas foram obtidas pelo APD3 (Antimicrobial Peptide Database - <http://aps.unmc.edu/AP/>). **66**
- Tabela 2** - Percentagem de desvio relativo do biossensor antes e depois da interação com a bactéria em diferentes concentrações. ^a Sistema sensor= Cys_AuNPs-AMB_ClavA antes do contato com as bactérias (10^1 - 10^7 CFU mL⁻¹); ^b Após contato com *E. coli*; ^c Após contato com *K. pneumoniae*; ^d Após contato com *S. typhimurium*; ^e Após contato com *B. subtilis*, ^f Após contato com *E. faecalis*; ^g Após contato com *S. aureus*. **87**
- Tabela 3** - Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância. **90**
- Tabela 4** - Plataformas biossensoras formadas por peptídeos antimicrobianos seguida de seus microrganismos alvo e limites de detecção. **94**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês <i>atomic force microscopy</i>)
AMB	Ácido 4-Mercaptobenzóico
arctan	Arco-tangente
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
CA	Correntes alternadas
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês <i>Center for Diseases Control</i>)
CE	Contra-Eletrodo
ClavA	Clavanina A
cm	Centímetro
Cys	Cisteína
DCE	Dupla Camada Elétrica
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
Eq.	Equação
ER	Eletrodo de Referência
ET	Eletrodo de Trabalho
EUA	Estados Unidos da América
f	Frequência
Fig.	Figura
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>)
IE	Impedância Elétrica
IH	Infecção Hospitalar
IRAS	Infecção relacionada à assistência da saúde
ITU	Infecções do Trato Urinário
L	Litros
LPS	Lipopolissacarídeo

M	Mol
MAM	Monocamadas automontadas
mL	Mililitro
mV	Milivolt
NHS	N-Hidroxisuccinimida
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
Ox	Forma oxidada do par redox
PAM	Peptídeos Antimicrobianos
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
PEH	Plano Externo de Helmholtz
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIH	Plano Interno de Helmholtz
Red	Forma reduzida do par redox
seg	Segundos
t	Tempo
tan	Tangente
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
V	Volt
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VPN	Voltametria de Pulso Normal
VVL	Voltametria de Varredura Linear
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
%	Por cento
R_{ct}	Resistência à transferência de carga
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
US\$	Dólares americanos
€	Euros
C_{dl}	Capacitância de Dupla Camada Elétrica
R_p	Resistência de Polarização
Z_w	Impedância de Warburg
R_{Ω}	Resistência da Solução
K	Grau Kelvin
E_i	Potencial inicial
E_v	Potencial de Vértice
I	Corrente
Z	Impedância
Z_F	Impedância Faradaica
Ω	Ohm
ϕ	Ângulo de Fase
Z_{re} / Z'	Eixo Real da Impedância
Z_{im} / Z''	Eixo Imaginário da Impedância
$ Z $	Módulo da Impedância
ω	Frequência angular
PDR / ΔI	Percentagem de Desvio Relativo
ΔR_{ct}	Varição Relativa do R_{ct}
θ	Grau de Revestimento de Superfície

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	GERAL	21
2.2	ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	INFECÇÃO HOSPITALAR	22
3.1.1	Impactos da infecção hospitalar no mundo	23
3.1.2	Fatores predisponentes à infecção hospitalar	24
3.1.3	Principais sítios de infecção hospitalar	25
3.1.4	Microrganismos presentes em infecções hospitalares	26
3.1.4.1	Vírus, protozoários e fungos	27
3.1.4.2	Bactérias Gram positivas e Gram negativas	27
3.2	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO	31
3.2.1	Biossensores	32
3.3	ELETROQUÍMICA	34
3.3.1	Instrumentação eletroanalítica	35
3.3.2	Dupla camada elétrica	37
3.4	VOLTAMETRIAS	39
3.4.1	Voltametria cíclica	40
3.5	IMPEDÂNCIA ELETRICOQUÍMICA	46
3.5.1	Espectroscopia de impedância eletroquímica	47
3.5.2	Circuitos equivalentes	50
3.6	MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE ELETRODO: MONOCAMADAS AUTOMONTADAS	51
3.6.1	Estrutura e propriedades	52
3.6.2	Aplicações	54
3.6.3	Cisteína	55
3.7	NANOPARTÍCULAS DE OURO	57
3.7.1	Breve histórico	58
3.7.2	Síntese	58
3.7.3	Propriedades físico-químicas	60
3.7.4	Aplicações biomédicas	62

3.7.5	Aplicação em biossensores	63
3.8	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	65
3.8.1	Tipos e características estruturais	68
3.8.2	Mecanismos de ação	70
3.8.2.1	Conformação estrutural	70
3.8.2.2	Carga	71
3.8.2.3	Hidrofobicidade	72
3.8.2.4	Anfipaticidade	72
3.8.2.5	Ângulo polar	73
3.8.3	Aplicações	74
3.8.4	Clavanina A	75
4	METODOLOGIA	76
4.1	MATERIAIS	76
4.2	SÍNTESE E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO PELO ÁCIDO 4-MERCAPTOBENZÓICO	77
4.3	SÍNTESE DE CLAVANINA A	77
4.4	PREPARO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA	77
4.5	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	79
4.6	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1	A SIMPLE NANOSTRUCTURED IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED ON CLAVANIN A PEPTIDE FOR BACTERIAL DETECTION	79
5.1.1	Medidas UV-VIS	80
5.1.2	Caracterização morfológica	80
5.1.3	Caracterização eletroquímica da plataforma Cys_AuNPs-AMB_ClavA	81
5.1.4	Caracterização eletroquímica da detecção de bactérias pelo biossensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA	85
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	96
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A - A SIMPLE NANOSTRUCTURED IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED ON CLAVANIN A PEPTIDE FOR BACTERIAL DETECTION	120

1 INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares, também conhecidas como infecções nosocomiais constituem-se um problema de saúde pública atual e crescente. Descrevem-se como o tipo de infecção que é adquirida durante o atendimento hospitalar ou logo após a alta do paciente (Cornejo-Juárez *et al.*, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem desenvolvido diversos projetos objetivando a diminuição dos casos crescentes. Contudo, problemas têm acometido essas ações, tanto pela falta de entrosamento da própria equipe que forma o ambiente hospitalar, quanto pela falta de informação perpassada pela equipe médica e população (Pittet, Allegranzi e Boyce, 2009).

Todos esses problemas associados ao aumento da população idosa no mundo indicam um crescimento alarmante no gasto com a saúde. Cumpre salientar que o maior impacto acometerá as populações que margeiam a linha da pobreza (Nyamogoba e Obala, 2002; Reed e Kemmerly, 2009).

Apesar dos meios tradicionais de detecção de microrganismos existirem, é patente as limitações associadas ao custo elevado, necessidade de mão de obra especializada de alto custo, precariedade da infraestrutura hospitalar, falsos positivos, etc. Desta forma, é perceptível a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de detecção e diagnóstico presuntivo (Sin *et al.*, 2014).

Novos dispositivos inovadores vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de diminuir gastos e melhorar os limites para a detecção de analitos, permitindo também a possibilidade de aumentar a variedade de amostras que podem ser detectadas (Luong, Male e Glennon, 2008). Desta forma, PD&I voltado para o diagnóstico culminou com a elaboração de biossensores eletroquímicos, cujo mercado cresce consideravelmente.

Biossensores constituem-se uma alternativa inovadora que apresenta sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção como características marcantes. A referida tecnologia teve início na década de 50 com o desenvolvimento do primeiro biossensor proposto por Clark e Lyons, e desde então biossensores continuam no foco da investigação científica (Turner, 2013).

Biossensores descrevem-se como biodispositivos analíticos que compreendem um elemento sensor biológico ativo, podendo ser peptídeos, anticorpos, enzimas, fragmentos de DNA, células, etc., sendo responsável pela especificidade ao analito. Outro membro que compõe um biossensor é o transdutor físico-químico que converterá a detecção bioquímica em um sinal elétrico detectável (Perumal e Hashim, 2014). Apesar de existirem diferentes *designs* de biossensores, as técnicas de detecção elétricas e eletroquímicas são extensamente utilizadas devido à velocidade e simplicidade na detecção (Ahn *et al.*, 2011).

As técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica são dois exemplos de técnicas de medição eletroquímica, que são altamente sensíveis e amplamente utilizadas em estudos de superfícies e interfaces (Osipovich *et al.*, 2016). Qualquer alteração em alguma superfície em solução, como a de eletrodos de ouro de biossensores, culminará no deslocamento da corrente de pico catódica e anódica na voltametria e aumento ou diminuição no diâmetro do semicírculo de Cole-Cole no diagrama de Nyquist da impedância (Oliveira *et al.*, 2011).

A modificação da superfície desses biossensores determinam a sua habilidade de detectar um analito específico dentre outras substâncias presentes na amostra clínica. A referida modificação desempenha um papel essencial, influenciando diretamente as propriedades físico-químicas da superfície do biossensor, determinando sua habilidade de permitir interações específicas e bloqueando ligações não específicas (Bard, 1983; Shi e Porterfield, 2011).

Aminoácidos, além de serem imprescindíveis ao funcionamento do corpo humano, também apresentam utilidade na inovação biotecnológica (Arakawa *et al.*, 2007). Um exemplo é a cisteína, cujo uso em biossensores é crescente devido a sua estrutura, composta por um grupo tiol que tem elevada afinidade ao ouro. A associação Au-S permite a formação das monocamadas automontadas em superfícies, como a de um eletrodo de ouro, sendo um componente fundamental na estrutura e estabilidade do biossensor (Mukdasai *et al.*, 2016).

Nanopartículas metálicas, sobretudo as de ouro (AuNPs) têm uso datado desde a antiguidade para as mais diversas finalidades, e na área biotecnológica, tem sido empregada extensivamente na área de biossensores (Cao, Ye e Liu, 2011; Pingarrón, Yáñez-Sedeño e González-Cortés, 2008; Saha *et al.*, 2012; Yusoff *et al.*, 2015).

Suas características e propriedades físico-químicas únicas as qualificam como excelente escolha de componentes em uma plataforma biossensora nanoestruturada, principalmente por permitirem a ligação de diversas biomoléculas em sua superfície (Li, Schluesener e Xu, 2010).

Peptídeos antimicrobianos têm surgido como excelente alternativa frente ao alarmante problema de resistência aos antibióticos. Sua quantidade predisponente na natureza os tornaram alvo de inúmeras pesquisas, sendo encontrados tanto em animais terrestres e marinhos quanto em insetos, plantas e microrganismos (Bechinger e Gorr, 2016; Dong e Zhao, 2015; Ebenhan *et al.*, 2014; Seil e Webster, 2012).

No segmento do diagnóstico é abordada sua interação com diversos tipos de analitos, dentre os quais, bactérias. Seu contato com o analito ocorre de diversas formas, sendo uma delas a interação eletrostática (Hoyos-Nogués *et al.*, 2016).

A Clavanina A (ClavA) é um peptídeo antimicrobiano isolado do tunicado marinho *Styela clava* e apresenta aplicação em plataformas biossensores nanoestruturadas resultando em excelente detecção frente à microrganismos (Andrade *et al.*, 2015). No presente trabalho, este peptídeo foi utilizado como componente na plataforma Cys_AuNPs-AMB_ClavA para detecção de bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma plataforma biossensora nanoestruturada baseada no peptídeo antimicrobiano Clavanina A para a biodeteção de bactérias Gram positivas e Gram negativas de interesse clínico através de técnicas eletroquímicas e análise topográfica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adsorver e avaliar a deposição da monocamada automontada de cisteína sobre a superfície do eletrodo de ouro;
- Sintetizar nanopartículas de ouro e modificá-las com AMB;
- Determinar o tamanho e potencial Zeta das nanopartículas de ouro modificadas por AMB;
- Analisar os parâmetros físico-químicos da modificação de superfície utilizando nanopartículas de ouro associadas a Clavanina A;
- Avaliar as características eletroquímicas da interação das bactérias com o sistema sensor;
- Definir o circuito equivalente para obtenção de parâmetros eletroquímicos;
- Determinar o limite de detecção obtido pelo biossensor;
- Obter as correntes de pico anódicas (i_{pa}) e catódicas (i_{pc}) das diferentes etapas de modificação do eletrodo de trabalho e após interação com as bactérias por meio da voltametria cíclica;
- Analisar a morfologia e estrutura do sistema sensor antes e após contato com as bactérias utilizando microscopia de força atômica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INFECÇÃO HOSPITALAR

Infecção hospitalar (IH), também conhecida como infecção nosocomial e infecção relacionada à assistência da saúde (IRAS) é definida pelo Ministério da Saúde como infecção adquirida após admissão do paciente, o qual a manifestação ocorreu durante a internação ou após a alta, podendo ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (Ministério da Saúde, 1998). Infecções contraídas no hospital que aparecem após a alta do paciente e as que atingem o os funcionários no ambiente hospitalar também são consideradas nosocomiais (Ducel, Fabry e Nicolle, 2002; Benenson *et al.*, 1995).

Infecções ocasionadas por microrganismos são datadas de séculos atrás com o surgimento de grandes hospitais no século XIX, principalmente quando ligadas a epidemias que ocorriam em ambientes onde moravam populações pobres, além das péssimas condições de saneamento básico e higiene como um todo, a qual estava atrelada a população daquela época (Moura *et al.*, 2008).

Uma das principais causas da continuidade de alastramento dessas doenças se devia à má condução dos pacientes, o qual com o exemplo de sanatórios na Idade Média até o século passado, eles eram isolados em locais não iluminados e fechados, sem o menor cuidado higiênico ou alimentar. Todos esses fatores auxiliam na propagação de doenças transmissíveis, levando-se a crer que as IH tiveram origem nesses mesmos locais e períodos (Andrade e Angerami, 1999; Maciel e Cândido, 2010).

O cenário decadente de insalubridade dos hospitais começou a mudar com as ações de Louis Pasteur, trazendo diversas contribuições primordiais na área da microbiologia e da medicina, indicando mudanças na prática médica/hospitalar, apontando a simples limpeza das mãos como fator importante na diminuição da contaminação cruzada com microrganismos, principalmente em procedimentos cirúrgicos invasivos e utilizou a ideia da imunidade obtida após a contaminação por alguma doença. Apenas no início do século XX foram

dados importantes passos no estudo da IH, além de sua prevenção e epidemiologia (Pasteur, Joubert e Chamberland, 1878; Fontana, 2006).

3.1.1 Impactos da infecção hospitalar no mundo

Mesmo com o avanço da medicina com o passar das décadas até os dias atuais, a IH continua sendo um problema de saúde pública em todo mundo, com números de casos alarmantes. No início da década passada, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), presumia-se que anualmente cerca de 1,4 milhões de pessoas em todo mundo sofriam de algum tipo de infecção adquirida no ambiente hospitalar, estimando-se 80.000 mortes a cada ano (Ducel, Fabry e Nicolle, 2002; Nazir e Kadri, 2014).

Dados da OMS sugerem que apenas na Europa, cerca de 4 milhões de pessoas são infectadas por ano, e nos EUA, 1,7 milhões (World Health Organization, 2011). No Brasil, entre 5-15% dos pacientes hospitalizados e 25-35% que entram na unidade de terapia intensiva adquirem IH, ocupando a quarta causa de mortalidade no país (Maciel e Cândido, 2010). As unidades de terapia intensiva apresentam quantidade de casos maiores em relação a outras áreas presentes no hospital. A IH representa de 11 a 90 casos a cada 1000 pacientes adultos e 40 a 60 casos a cada 1000 neonatos (Pittet *et al.*, 2008).

Os motivos em que os maiores números de casos de IH ocorrem em países em desenvolvimento em relação aos países desenvolvidos vai além das diferenças culturais, agindo principalmente nos aspectos econômicos. Para esses países, a precariedade do saneamento básico e a infraestrutura hospitalar falha; o uso de equipamentos já considerados ultrapassados; a falta de políticas atuantes no controle de infecções e particularmente devido a coexistência de outros problemas de saúde que acometem essas populações, são fatores cruciais que determinam os riscos aumentados de se ter infecções no ambiente hospitalar (Murni *et al.*, 2013).

Dados apontam que em países industrializados, a IH é um problema que alcança de 5-10% dos pacientes hospitalizados. Já os riscos em países em desenvolvimento podem chegar a ser vinte vezes maiores, em uma proporção que pode exceder o número de 25% de pacientes infectados, determinando, dessa forma, uma maior necessidade de atenção sobre essas populações (Allegranzi e Pittet, 2007; Pittet e Donaldson, 2005). Cerca de 75% da carga de IH estão presentes em países em desenvolvimento (Khan, Ahmad e Mehboob, 2015).

Além da desestabilidade da saúde dos pacientes, a IH determina estresse emocional, principalmente nos países em desenvolvimento no que diz respeito aos custos que envolvem o tratamento do paciente, seja ele gasto por parte do paciente, quanto por parte dos cofres públicos, ultrapassando a barra dos bilhões de dólares (Nazir e Kadri, 2014).

O tempo contínuo em que o paciente permanece no ambiente hospitalar é um dos motivos mais frequentes, desencadeando o aumento do uso de medicamentos, a necessidade de isolamento e o uso de testes laboratoriais e estudos de diagnóstico adicionais (Ducel, Fabry e Nicolle, 2002). Apenas nos EUA e Europa, os gastos com IH foram de U\$S 6,4 bilhões e € 7 bilhões respectivamente, levando-se a crer que se em países desenvolvidos o custo financeiro é imenso, em países considerados de segundo e terceiro mundo o impacto econômico é muito maior, necessitando-se de intervenções para que a situação se reverta (World Health Organization, 2011).

3.1.2 Fatores predisponentes à infecção hospitalar

Muitas fontes promovem a infecção em pessoas hospitalizadas, apresentando destaque: a baixa imunidade dos pacientes; a criação de novas formas de procedimentos cirúrgicos e técnicas invasivas que promovem novas rotas de infecção e a transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos pela equipe médica que compõe determinado hospital (Ducel, Fabry e Nicolle, 2002).

Este último se mostra um problema ainda recorrente, o qual diversos estudos apontam que as mãos de médicos e enfermeiros, por exemplo, tem papel fundamental na propagação de microrganismos no ambiente hospitalar e diretamente aos pacientes (WHO, 2009).

Tais condições desencadeiam a colonização da pele do paciente por diversos patógenos que se encontram na superfície de objetos como maca, roupas, acessórios, porta, etc., tudo levando à contaminação do ambiente. Foi mostrado que muitos microrganismos tem a capacidade de sobreviver nas mãos da equipe médica por diversos minutos, tudo isso levando à sua propagação (Allegranzi e Pittet, 2009). Diante de todas as possibilidades de se ter ou promover a IH, todo cuidado é necessário, sendo que 1/3 das IH poderiam ser evitadas (Peleg e Hooper, 2011).

Dependendo do tipo de promoção à saúde a que o paciente está inserido, a IH apresenta diferentes fatores de risco, os quais os mais comuns, independente da área de ocorrência, são: idade maior que 65 anos; permanência no hospital por mais de 7 dias; admissão hospitalar na emergência ou na UTI; inserção de cateteres venosos e urinários ou tubo endotraqueal, com falta ou precariedade de limpeza e esterilização; imunossupressão induzida por traumas; status de coma e ser submetido à cirurgias, principalmente as que demoram horas para finalizar (World Health Organization, 2011).

3.1.3 Principais sítios de infecção hospitalar

Por fins de classificação, o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) distribuiu os sítios de IH em 13 tipos principais, com 50 tipos diferentes de infecção, separados por critério biológico e clínico. Dentre esses sítios, os que mais apresentam casos a nível mundial em hospitais são: infecções do trato urinário (ITU); infecções na corrente sanguínea; infecções cirúrgicas; infecções respiratórias, gastroenterite e meningite (Raka *et al.*, 2006).

Entretanto, é notável o aumento no número de casos de IH mesmo com o avanço na medicina, que proveu um acréscimo considerável de procedimentos terapêuticos, principalmente por métodos invasivos; quimioterapia; imunoterapia e avanços no transplante de órgãos, todos esses elementos facilitando e promovendo novas formas de os microrganismos infectarem o paciente (Khan, Ahmad e Mehboob, 2015).

Apesar de algumas infecções serem adquiridas no terreno hospitalar, muitos casos não podem ser considerados IH. Há casos em que mesmo o paciente se mostrando assintomático, julga-se IH, quando patógenos são encontrados em fluidos corporais ou em sítios cirúrgicos estéreis, como o sangue e líquido cefalorraquidiano. Casos em que infecções são adquiridas pela equipe hospitalar, visitantes e infecção neonatal resultante de um parto, são consideradas nosocomiais (Chikere, Omoni e Chikere, 2008).

Em adição, existem duas situações em que determinada infecção não é declarada nosocomial: (1) infecções que são associadas a uma complicação ou extensão de uma infecção já presente na admissão do paciente, mesmo que patógenos e sintomas mudem resultando em uma nova infecção; (2) infecções adquiridas por neonatos de forma transplacentária devido a doenças como toxoplasmose, rubéola, sífilis e citomegalovírus, aparecendo 48 horas após o nascimento (Bereket *et al.*, 2012).

3.1.4 Microrganismos presentes em infecções hospitalares

Há uma grande diversidade de patógenos que podem ocasionar infecções nosocomiais. Tais organismos infectantes variam de região para região, população, diferentes sistemas de saúde e instalações médicas e, portanto, de um país para outro. Dentre eles, se destacam as bactérias, os fungos, os vírus e alguns parasitas (Ducel, Fabry e Nicolle, 2002).

3.1.4.1 Vírus, protozoários e fungos

Apesar de apresentarem uma menor proporção em relação às bactérias, os vírus se enquadram nas possibilidades de os pacientes contraírem alguma infecção (Aitken e Jeffries, 2001). As maneiras mais comuns de vírus infectarem o hospitalizado concretiza-se principalmente por meio da transfusão sanguínea, diálise, injeções e endoscopia. Se destacam a hepatite B e C, rotavírus, HIV, HSV, influenza vírus e citomegalovírus (Ducel, Fabry e Nicolle, 2002).

Alguns protozoários como a *Giardia lamblia* podem ser facilmente transmitidas entre adultos e crianças, desencadeando algum tipo de infecção. Muitos fungos são organismos oportunistas e causam infecção durante a antibioticoterapia e imunossupressão severa. Os mais frequentes casos relevam infecção por *Candida albicans*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptosporidium*, representando a principal causa de infecção sistêmica entre pacientes imunocomprometidos. Fungos caracterizam 8% dos casos, o qual os do gênero *Candida sp.* relatam o maior número de ocorrências (Maciel e Cândido, 2010; Yang *et al.*, 2013).

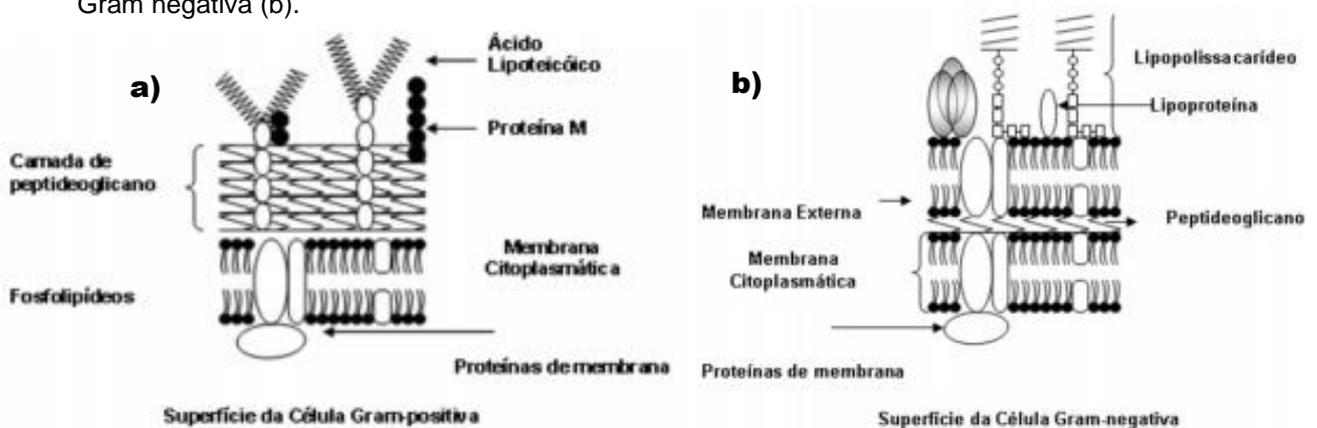
3.1.4.2 Bactérias Gram positivas e Gram negativas

Apesar de existirem muitos agentes que acarretam a IH, as bactérias Gram positivas e Gram negativas merecem maior relevância, pois a maioria das ocorrências de IH em todo mundo destaca a infecção por esses tipos de microrganismos que estão presentes em 90% dos casos, em relação aos fungos, vírus e parasitas (Bereket *et al.*, 2012; Khan, Ahmad e Mehboob, 2015). Suas principais características de parede celular podem ser vistas na Figura 1 a-b.

Uma distinção entre elas pode ser feita, separando-as em comensais e patogênicas. As bactérias comensais são encontradas na flora de pessoas saudáveis. Elas representam um papel de proteção contra bactérias patogênicas e só apresentam possibilidade de infectar o paciente principalmente se o mesmo

estiver imunodebilitado. Por exemplo, estafilococos coagulase negativos presentes no tecido cutâneo, como o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, podem causar infecção intravascular; e a *Escherichia coli* que se encontra no intestino, são as mais comumente encontradas em casos de infecção do trato urinário (Ziebuhr *et al.*, 2006). As bactérias patogênicas apresentam grande virulência, e causam infecções esporádicas ou epidêmicas independentemente do estado do hospedeiro.

Figura 1 - Representação esquemática da superfície da parede de bactéria Gram positiva (a) e Gram negativa (b).



Fonte: Araujo *et al.*, 2010.

Como exemplo, as bactérias Gram positivas como *Staphylococcus sp.* e *Enterococcus sp.*, bem como estreptococos beta hemolíticos causam uma ampla variedade de infecções, dentre elas, infecção de pulmão, de ossos, das valvas cardíacas e da corrente sanguínea (Calfee *et al.*, 2014; Vidana *et al.*, 2015). A maioria dessas bactérias patogênicas estão intimamente associadas à resistência a antimicrobianos, havendo destaque nas populações de países em desenvolvimento, principalmente devido à falta de informação e uso descontrolado de antibióticos, sendo muitos deles sem prescrição médica (Allegranzi e Pittet, 2007; Vernet *et al.*, 2014; Woodford e Livermore, 2009).

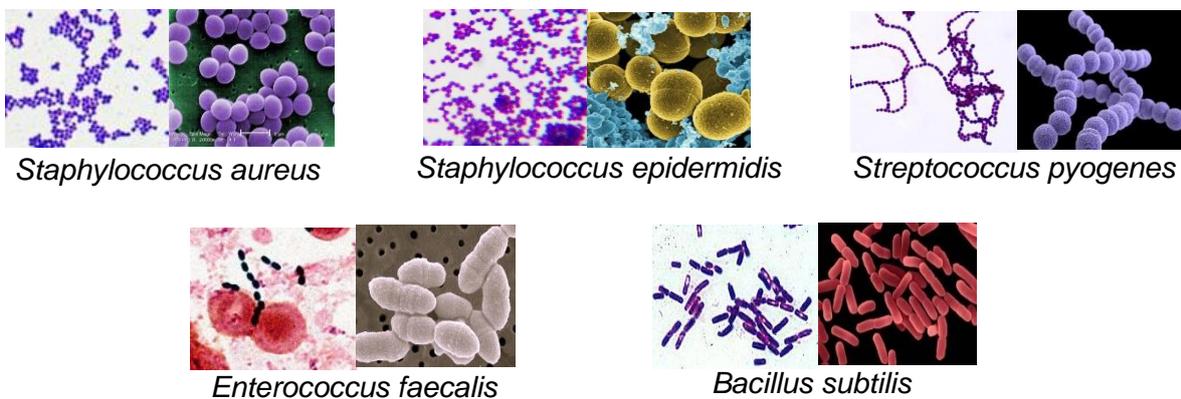
Bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* e *Serratia marcescens* também causam IH pois podem colonizar sítios onde as defesas estão comprometidas, como áreas de inserção de cateteres e cânulas, e causam sérias infecções, dentre elas, infecções no sítio cirúrgico, de pulmão,

infecção peritoneal e bacteremia. Assim como as Gram positivas, muitas dessas bactérias também apresentam resistência a antimicrobianos, agravando o quadro do paciente (Li, Plésiat e Nikaido, 2015; Mehrad *et al.*, 2015).

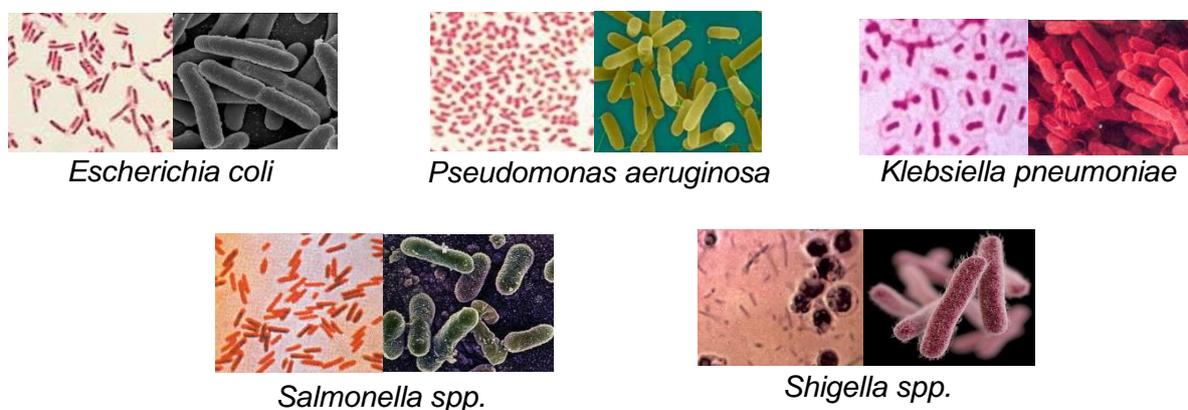
Relacionando a frequência de tipos de infecções nosocomiais e as bactérias presentes nos casos, constatou-se que as Gram positivas são mais associadas a infecções na corrente sanguínea e infecções no sítio cirúrgico; enquanto que as Gram negativas representam 30% das IH, em que são mais frequentemente atribuídas a casos de pneumonia por ventilação e infecção do trato urinário (Peleg e Hooper, 2011; Weinstein, Gaynes e Edwards, 2005). As características microscópicas das bactérias mais frequentemente causadoras de IH são descritas na Figura 2.

Figura 2 - Microscopia óptica (da técnica de Gram, esquerda) e microscopia eletrônica (direita) das principais bactérias Gram positivas e Gram negativas encontradas em casos de infecção hospitalar.

Gram positivas



Gram negativas



Fonte: Google imagens.

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa e oxidase negativa. É um dos microrganismos mais envolvidos na sepse e choque induzido por endotoxinas. Infecções do trato urinário e de ferimentos, pneumonia em pacientes hospitalizados imunocomprometidos, meningite em neonatos e gastroenterite são infecções comuns causadas por este organismo (Khan, Ahmad e Mehboob, 2015). *E. coli* dispõe de uma ampla variedade de fatores de virulência, algumas delas divididas pela família Enterobacteriaceae, como endotoxinas, cápsula, variação de fase antigênica e resistência a antimicrobianos (Bereket *et al.*, 2012).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram negativo encapsulado, anaeróbio facultativo e oxidase negativo, pertencendo à família Enterobacteriaceae. Em adição, 3 a 7% das infecções adquiridas no ambiente hospitalar são relacionadas à *K. pneumoniae* e é o oitavo patógeno com maior significância no setor da saúde (Khan, Ahmad e Mehboob, 2015). Geralmente está associada à colonização do trato gastrointestinal, faringe e da pele. Está envolvida em especial à septicemia neonatal, pneumonia, infecção de ferimentos e septicemia. Seus fatores de virulência incluem endotoxinas, receptores de parede celular e polissacarídeo capsular (Lin *et al.*, 2015).

Enterococcus faecalis é outro microrganismo presente na IH, sendo considerado a segunda causa de infecções hospitalares a nível mundial (Khan, Ahmad e Mehboob, 2015). São cocos Gram positivos que se arranjam em pares e cadeias curtas. São anaeróbios facultativos e oxidase negativo, apresentando um amplo crescimento numa temperatura que varia de 10°C a 45°C. Elas são a causa de endocardite, infecção de sítio cirúrgico e da corrente sanguínea, bacteremia, infecção do trato urinário, sepse neonatal e meningite (Arias e Murray, 2012; Teixeira *et al.*, 2013). Fatores de virulência incluem proteínas de superfície extracelular, citolisinas, hemolisinas, gelatinase e superóxido extracelular (Sood *et al.*, 2008).

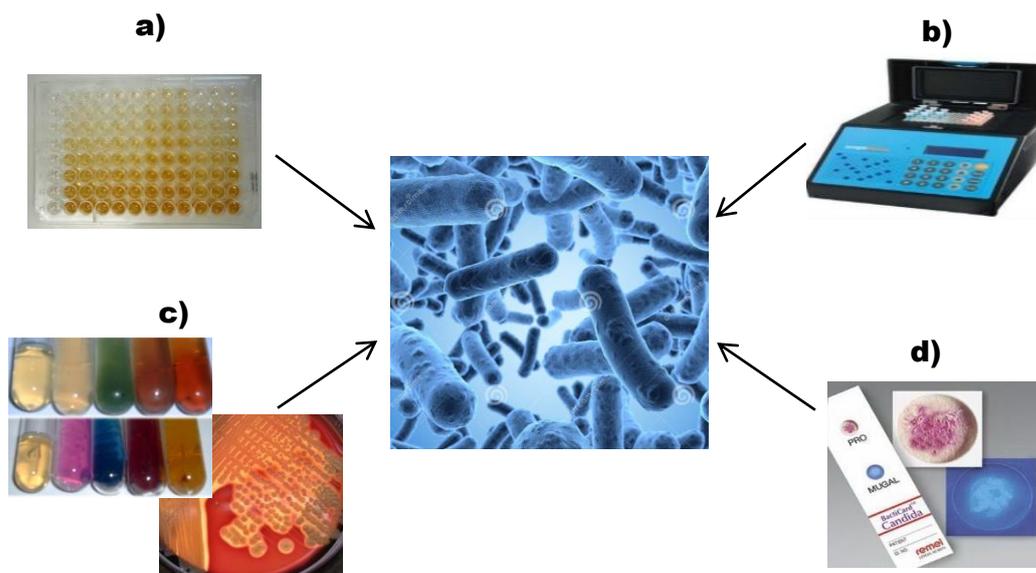
Bacillus sp. são bactérias Gram positivas aeróbias e esporuladas, encontrada no solo e da água. Apesar de serem pouco patogênicos, as espécies que mais aparecem em raros casos de IH, são a *Bacillus subtilis* e *Bacillus*

cereus. Sendo patógenos oportunistas com infecções contra pacientes imunocomprometidos e da UTI, desencadeiam pneumonia, sepse e bacteremia, podendo provocar infecções fatais (Hosein *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 1988).

3.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO

Os meios de detecção existentes para o diagnóstico presuntivo de bioanalitos como microrganismos são diversos, como representado na Figura 3 a-d. Destacam-se o ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) (Verma, Saxena e Babu, 2013), que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas; os tradicionais testes comerciais de meios de cultura específicos e seletivos (Mohammadkazemi, Azin e Ashori, 2015). Testes moleculares são outros utilizados na detecção de analitos, dentre os quais, destaca-se a reação em cadeia de polimerase (PCR) (Gadsby *et al.*, 2015; Muthukumar, Zitterkopf e Payne, 2008).

Figura 3 - Métodos de diagnóstico presuntivo mais frequentemente utilizados. ELISA (a), PCR (b), meios de cultura sólidos, semissólidos e líquidos (c) e testes rápidos enzimáticos (d).



Fonte: Google imagens.

Apesar de sua utilidade, alguns pormenores necessitam de atenção. Muitos desses testes finalizam-se com falso-positivos, além do elevado tempo de espera para o crescimento do microrganismo e dificuldade para isolá-lo e reação enzimática no meio, o qual estipula-se crescer após 24-72h após o semeio (Lodish *et al.*, 2008; Terato *et al.*, 2014).

Procedimentos moleculares exigem, além da acurácia do profissional no preparo da reação e leitura dos resultados, tempo para reação adequada e diversos cuidados no manuseio e estocagem dos reagentes, que possuem alto custo no mercado (López *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2006).

Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas alternativas inovadoras, com o objetivo de ter uma resposta melhor à detecção de determinado analito, além de valor mais acessível. Não há dúvida sobre o aumento no interesse para o desenvolvimento de dispositivos aplicáveis à saúde e dia-a-dia da população. Com os avanços da nanociência e o desenvolvimento tecnológico, possibilitou-se a criação de biodispositivos de detecção, como os biossensores.

3.2.1 Biossensores

Biossensores constituem-se uma excelente alternativa de método analítico, dispendo de rapidez e sensibilidade na detecção de analitos de interesse clínico (Saleem, 2013). Está no foco da investigação científica desde que Leland C. Clark, durante seu trabalho envolvendo técnicas eletroquímicas, criou um dispositivo para detectar o oxigênio presente no sangue utilizando eletrodos (Clark, 1956).

Ao utilizar enzimas para auxiliar na transdução desse dispositivo, melhorou consideravelmente a sensibilidade do eletrodo, usando pela primeira vez a palavra “biossensor” (Clark e Lyons, 1962).

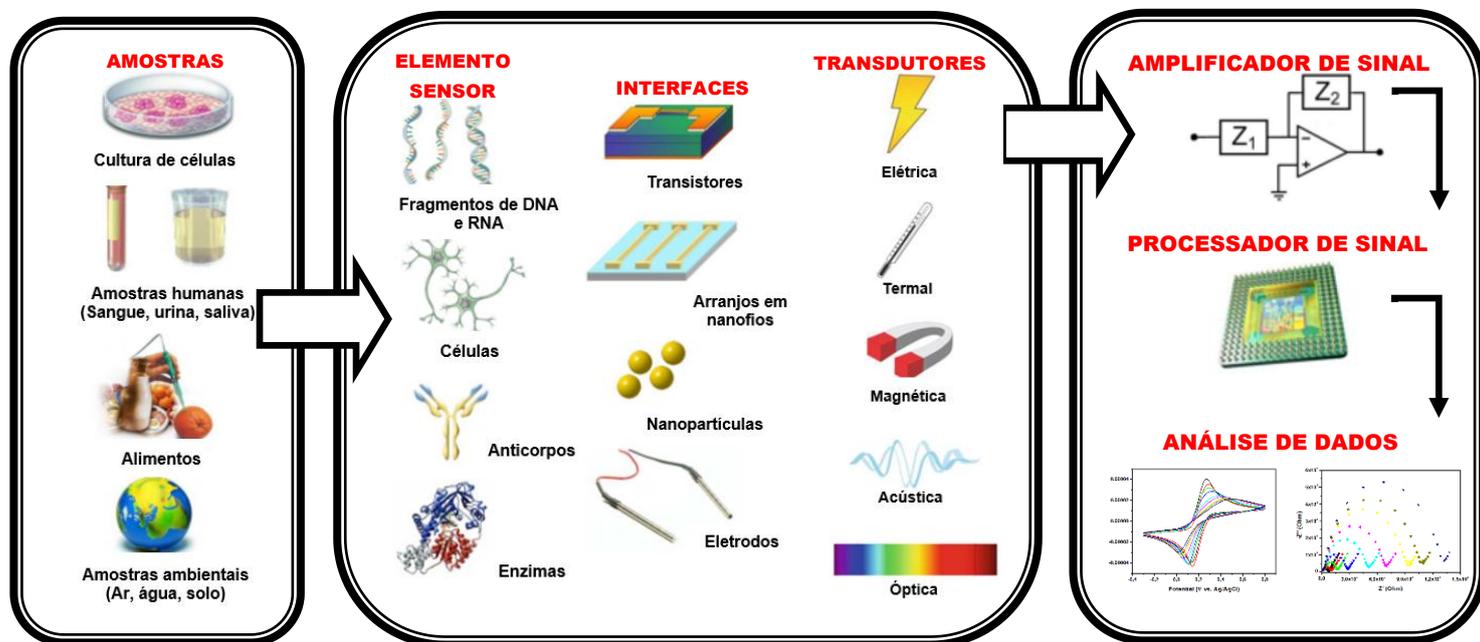
Ao longo dos anos, o número de estudos dedicados à pesquisa e aplicação de biossensores cresceu veementemente, cujo resultado vê-se no

mercado mundial de biossensores. Um estudo indica que tal mercado cresceu consideravelmente de € 119.4 bilhões no ano de 2006 para € 184.1 bilhões em 2016 (Scognamiglio *et al.*, 2016).

A constituição de um biossensor compreende: 1) um elemento sensor biológico ativo, que será responsável pela especificidade ao analito em questão e 2) um transdutor físico-químico que converterá a detecção bioquímica em um sinal elétrico detectável (Grieshaber *et al.*, 2008; Luz, Iost e Crespilho, 2013).

Os elementos sensores que mais se apresentam na literatura são os peptídeos (Wang, Li e Wang, 2016), anticorpos (Li *et al.*, 2015), enzimas (Das *et al.*, 2016), células (Liu *et al.*, 2014) e fragmentos de DNA (Kumar, Dash e Sharma, 2007) e RNA (Franco *et al.*, 2015). Os transdutores mais comumente utilizados são o óptico, eletroquímico, calorimétrico, piezoelétrico, acústico e magnético (Perumal e Hashim, 2014). Tais itens estão representados na Figura 4.

Figura 4 - Componentes típicos de um biossensor



. Fonte: Adaptado de Grieshaber *et al.*, 2008.

3.3 ELETROQUÍMICA

O estudo da eletroquímica é datado de séculos atrás, tendo início com Luigi Galvani, cientista italiano do século XVIII. Em um de seus trabalhos envolvendo a dessecação de sapos, ao tocar acidentalmente as terminações nervosas do animal com placas metálicas, observou que os músculos sofriam contração. Esse fato foi uma das primeiras evidências que serviu de pontapé inicial no estudo da eletroquímica, o qual pesquisas posteriores resultaram na definição de corrente elétrica (Cajavilca, Varon e Sternbach, 2009).

Assim sendo, a eletroquímica define-se como a ciência que estuda reações químicas na interface de um condutor de elétrons: o eletrodo; e um condutor iônico, sendo ele o eletrólito. A transferência de carga entre as espécies é chamada reação redox (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015).

Concomitantemente com suas aplicações em estudos de processos de oxidação-redução para solucionar mecanismos reacionais, técnicas eletroquímicas também podem ser empregadas no estudo da termodinâmica e cinética de vários processos, como as de troca iônica e eletrônica (Bard *et al.*, 2001)

Técnicas eletroquímicas têm se mostrado ferramentas úteis para o estudo da detecção e diferenciação de diversos analitos, dentre eles estão os microrganismos, como bactérias Gram positivas e Gram negativas, detectados por meio dos biossensores eletroquímicos (Perumal e Hashim, 2014).

Dentre as múltiplas técnicas utilizadas na finalidade de detecção de patógenos, as técnicas voltamétricas e impedimétricas têm ganho amplo destaque devido às suas diversas vantagens, dentre as quais o relativo baixo custo dos instrumentos, excelente sensibilidade para uma variada concentração de compostos orgânicos e inorgânicos, relativa rapidez de análise da amostra e determinação simultânea de vários analitos (Thomas e Henze, 2001).

3.3.1 Instrumentação eletroanalítica

Jaroslav Heyrovsky, vencedor do prêmio Nobel em 1959, a partir da descoberta da polarografia em 1922 desenvolveu a técnica denominada “voltametria”. Ela baseia-se na relação voltagem-corrente-tempo que ocorre em uma célula eletroquímica (Bagotsky, 2006; Farghaly, Hameed e Abu-Nawwas, 2014). É um dispositivo onde ocorrem as reações eletroquímicas.

A constituição mais comum de uma célula eletroquímica é composta por (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015): (1) Eletrodo, que é o dispositivo condutor de elétrons, cuja reação eletroquímica ocorre em sua superfície; (2) Eletrólito, condutor iônico que contém íons que se movem livremente entre os eletrodos presentes na célula; (3) Circuito eletrônico externo, o qual além de conectar os eletrodos, tem o papel de detectar e controlar a corrente, voltagem ou condutância de um circuito.

Para experimentos envolvendo voltametria e impedância, dependendo da finalidade, a célula eletroquímica pode conter dois, três ou quatro eletrodos. A célula de dois eletrodos é usada para investigar propriedades eletrolíticas como condutividade ou para caracterizar sistemas de estado sólido (Figura 5 a).

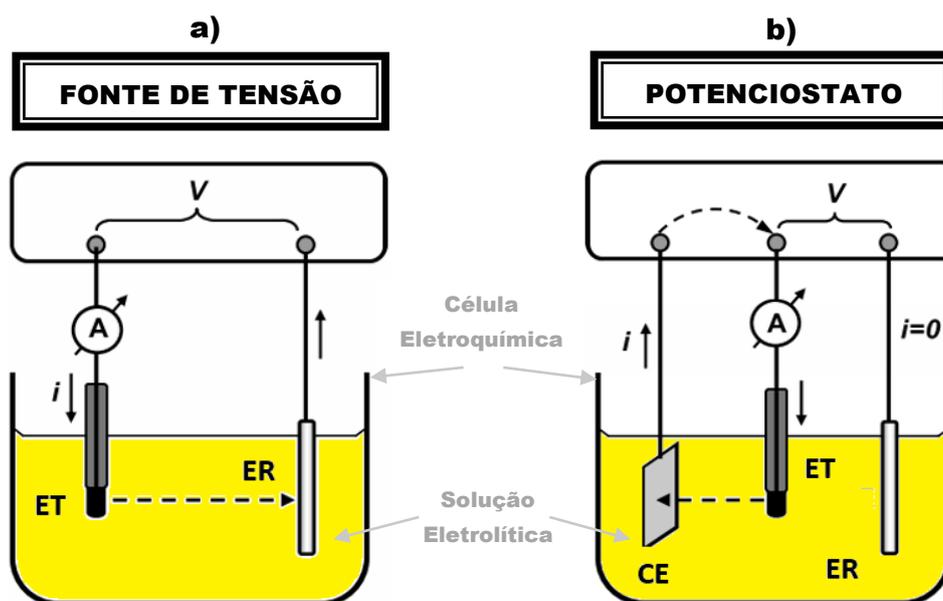
A configuração de três eletrodos (Figura 5 b) é a mais comum para aplicações eletroquímicas. Um terceiro eletrodo (eletrodo de referência) é adicionado. Já a célula contendo quatro eletrodos tem como objetivo analisar processos ocorrendo dentro do eletrólito, cuja medida é feita por eletrodos separados por uma membrana. Esse tipo de célula é geralmente utilizado para estudos de transporte iônico através de uma membrana ou para realizar medidas de condutividade iônica ou eletrônica (Oelßner, 2014).

Para análises de técnicas voltamétricas, é recomendado o uso da célula contendo três eletrodos devido aos inconvenientes encontrados nos outros tipos de configurações. Os três eletrodos utilizados são: eletrodo de referência (ER), o contra-eletrodo (CE), também chamado eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho (ET) (Bard *et al.*, 2001).

O ER tem como objetivo manter um potencial estável e reproduzível, o qual o potencial do ET é medido contra ele, cujo potencial aplicado resultante produz um sinal de excitação. O CE é utilizado para fornecer uma corrente através da célula, frequentemente oxidando ou reduzindo a solução eletrolítica, preservando a eletroneutralidade do sistema (Gulaboski e Pereira, 2008; Pacheco *et al.*, 2013).

O ET é o eletrodo onde ocorrem as reações ou transferências eletrônicas de interesse, o qual no caso de biossensores, é o eletrodo no qual é realizada a modificação de superfície, deixando-o apto para receber o analito de interesse (Bard, 1983). Os mais utilizados são os eletrodos em disco, principalmente compostos por ouro, grafite e pasta de carbono, cada qual com uma área bem definida. E dependendo da finalidade de aplicação do ET, outras geometrias também podem ser utilizadas, como forma cilíndrica, faixa, rede, matriz, etc., cada qual envolvendo uma modificação apropriada para análise de dados posterior (Farghaly, Hameed e Abu-Nawwas, 2014; Marken, Neudeck e Bond, 2010).

Figura 5 - Célula eletroquímica para determinações potenciométricas. ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência; CE: contra-eletrodo. As setas indicam o fluxo da corrente. (a) Célula de dois eletrodos; (b) Célula de três eletrodos.



Fonte: Adaptado de Banica, 2012.

A voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são as principais técnicas utilizadas para se obter informações qualitativas de reações eletroquímicas que ocorrem em células eletroquímicas, oferecendo rápida localização de potenciais redox de espécies eletroativas. A transferência de carga entre um eletrodo e a espécie eletroativa presente em uma solução engloba uma reação de eletrodo (Andrienko, 2008). Também chamada de eletrólise, essa reação implica alguns passos:

- O reagente (O) se move para a interface: transporte de massa;
- A transferência eletrônica pode ocorrer por meio do tunelamento mecânico quântico entre o eletrodo e o reagente que está próximo ao eletrodo (a distância de tunelamento se dá em menos de 2 nm);
- O produto (R) se afasta do eletrodo e permite que um novo reagente se ligue à superfície.

A circulação da corrente em um eletrodo ocorre na forma de um fluxo de elétrons. Para que a corrente atravesse a interface eletrodo/solução, faz-se necessária uma reação eletroquímica, que envolve espécies eletroativas na solução, cuja reação pode ser formulada de forma geral, como:



Onde, Ox e Red são as formas oxidada e reduzida do par redox, respectivamente. Portanto, a velocidade de uma reação eletroquímica limita a intensidade da corrente, o qual determina a quantidade de elétrons que atravessarão a interface por unidade de tempo (Bănică, 2012a).

3.3.2 Dupla camada elétrica

No início do século XX, dois pesquisadores chamados Georges Gouy e David L. Chapman introduziram a noção de uma dupla camada elétrica (DCE) difusa na superfície de eletrodos, resultado da movimentação de íons e suas interações eletrostáticas com determinada superfície (Bagotsky, 2006; Tadros,

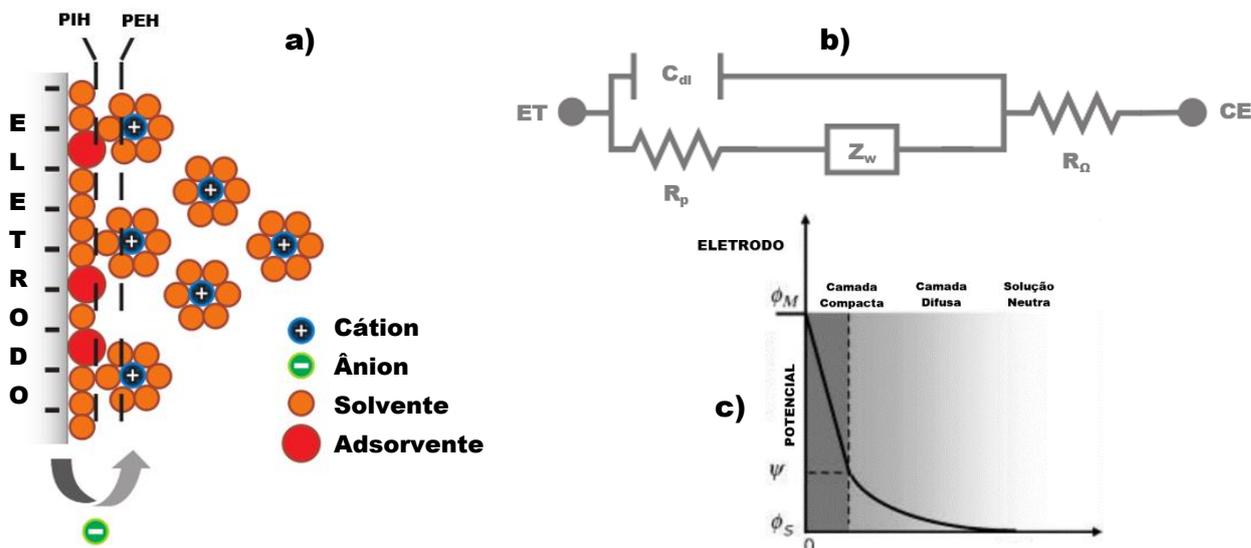
2013). A formação da DCE está intimamente interligada à existência de potenciais de Galvani entre duas fases condutoras diferentes, como exemplo, de duas camadas paralelas apresentando cargas de sinais opostos.

A carga negativa de um eletrodo (Figura 6 a) é balanceada pelos cátions que são atraídos para a superfície do eletrodo, enquanto que os contra-íons na solução eletrolítica são distribuídos por uma determinada distância do eletrodo. Assim, a DCE consiste de uma camada compacta, que é o plano interno de Helmholtz (PIH) e a camada difusa, também chamada de camada de Gouy-Chapman (Bănică, 2012a). O limite de extensão da camada difusa na solução eletrolítica depende da concentração do eletrólito, e com isso, a dupla camada pode afetar a cinética de processos eletroquímicos em alguns casos (Marken, Neudeck e Bond, 2010).

Uma das principais características da DCE é a distância entre as duas camadas que a formam, a qual por ser muito pequena, chega ao nível molecular entre 0,1 e 0,4 nm (Bagotsky, 2006). Dependendo da forma do eletrodo usado, no que diz respeito ao ET, sugere-se que a espessura da DCE possa chegar a 1 nm (Marken, Neudeck e Bond, 2010). No entanto, o perfil potencial-distância através da DCE envolve dois seguimentos, um com aumento linear do PIH até o plano externo de Helmholtz (PEH) e outro com aumento exponencial com a camada difusa. Essa variação de potencial, dependendo da força iônica do meio, faz com que a espessura da DCE possa se estender por mais de 10 nm (Wang, 2000).

A DCE desenvolvida por uma interface eletrodo/solução tem a característica de se comportar como um capacitor, portanto, outro caminho para o fluxo da corrente é fornecido concomitantemente ao processo de transferência eletrônica (Scholz, 2015). A partir disso, medidas de impedância e voltametria se tornam excelentes ferramentas para a caracterização de reações eletroquímicas de eletrodo, além de fornecer informações em relação a características da DCE de determinado sistema (Bănică, 2012b).

Figura 6 - (a) Interface em que o eletrodo é carregado negativamente; (b) Elementos de circuito elétrico correspondendo à cada componente da interface; (c) Variação do potencial elétrico na interface do eletrodo. ET: eletrodo de trabalho; C_{dl} : capacitância de dupla camada elétrica; R_p : resistência de polarização; Z_w : impedância de Warburg; R_Ω : resistência da solução; CE: contra-eletrodo. Adaptado de Chang e Park, 2010.



Fonte: Adaptado de Chang e Park, 2010.

Diante de tais fatos, torna-se extremamente relevante o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos que podem ser produzidos pela interação de células eletroquímicas de três eletrodos com um elemento sensor responsivo a determinado analito, afetando assim alguns dos processos citados da DCE. Tal resposta se obtém a partir da mudança da impedância eletroquímica e da variação dos picos catódicos e anódicos da voltametria, sendo eles métodos de transdução de sinal utilizados na produção do presente trabalho.

3.4 VOLTAMETRIAS

A voltametria é um termo derivado da palavra “voltamperometria”, o qual expressa que a corrente é medida em função do potencial ($I = f(E)$), sendo a curva criada por essa função chamada de voltamograma (Faridbod, Norouzi e

Ganjali, 2015). Uma ampla área da química eletroanalítica é coberta pela técnica voltamétrica, incluindo a polarografia, área que serviu de marco para o avanço e criação de técnicas como a voltametria de varredura linear, as várias modalidades de voltametria de pulso e a promissora voltametria cíclica (Olson e Lacourse, 2004).

É importante salientar que a finalidade e qualidade de informação qualitativa/quantitativa que se deseja obter de determinado analito, ou processo que envolve a interação do analito com o eletrodo, direciona na escolha da técnica voltamétrica ideal para ser utilizada (Pacheco *et al.*, 2013). Para que seja realizado o experimento voltamétrico, é necessário pelo menos o uso de dois eletrodos: o ET, cujo analito está em contato com sua superfície e o potencial é aplicado a ele; e o ER, que serve de referência na medição e controle do potencial do ET. No entanto, a célula eletroquímica contendo três eletrodos, com o adicional do CE, favorece uma maior estabilidade do sistema (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Scholz, 2015).

Em técnicas de análise voltamétricas, os limites de detecção são dados geralmente em mol L⁻¹ por causa das correntes dependerem de concentrações molares devido a difusão. Assim, a natureza do composto eletroativo é menos importante nessas situações, pois os diferentes números de elétrons envolvidos nas reações que ocorrem no ET têm um efeito pequeno nos limites de detecção (Scholz, 2015).

Portanto, baseando-se no tipo/estrutura do eletrodo e tipo de eletrólito utilizado, além de como o potencial é aplicado e como a corrente é medida, as técnicas voltamétricas foram desenvolvidas. De forma breve será descrita a análise da voltametria cíclica, objeto de estudo do presente trabalho.

3.4.1 Voltametria cíclica

Por ser um dos produtos da criação da polarografia, a VC se assemelha a ela em alguns aspectos. Entretanto, quando há a aplicação de potencial de

varredura ao eletrodo seguindo uma direção, ela é considerada uma voltametria linear, e quando o potencial é aplicado em uma direção e volta, é denotada como voltametria cíclica. Assim, a VC oferece uma avaliação simples da reversibilidade de um processo de eletrodo, ou seja, uma comparação direta de uma reação catódica e anódica (Heyrovsky, 2014).

Dentre as técnicas voltamétricas existentes, a VC é uma das mais utilizadas em várias áreas da química. Geralmente, apesar de sua aplicação ser centrada no estudo de processos redox, comportamento de reações e detecção de intermediários, a técnica pode ser utilizada para análises quantitativas (Farghaly, Hameed e Abu-Nawwas, 2014; Wang, 2000). Ademais, ela permite adquirir informação sobre a proporção de elétrons transferidos entre substâncias e eletrodos; estima a relativa área de superfície; avalia a falta de eletrólitos na interface eletrodo/isolante, além de determinar a natureza dos processos químicos em conjunto com a transferência de elétrons (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Bilal, 2014).

Outra aplicação muito relevante da VC tem sido no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, sendo usado para avaliar a integridade de camadas moleculares formadas na superfície de um eletrodo, e no caso das técnicas eletroquímicas, o ET. Para isso, o íon ferricianeto pode ser usado como sonda redox. A análise de dados e simulações utilizando softwares dedicados à pesquisa voltamétrica permitem a determinação do mecanismo de reação das reações eletroquímicas que ocorrem no ET onde houve a modificação de superfície e contato com o analito (Andrade *et al.*, 2015; Bănică, 2012a; Tanimoto e Ichimura, 2013).

O sistema que forma o potenciostato impõe os parâmetros de controle para a realização dos experimentos voltamétricos, tendo como finalidade impor o potencial de varredura cíclico ao ET, apresentando uma resposta de corrente. A combinação de solvente, eletrólito e material específico do ET determina o limite do potencial. Assim, a corrente desenvolvida em uma célula eletroquímica pela ciclagem de potencial do ET é medida. A curva que representa a corrente

em função do potencial resultante é chamada de voltamograma cíclico (Kreysa, Ota e Savinell, 2014; Scholz, 2015).

As informações qualitativas adquiridas de um voltamograma cíclico sobre proporções relativas de reações e difusão com reagentes em um sistema eletroquímico é obtida a partir das características dos picos anódicos e catódicos. A corrente de pico aparece quando o potencial alcança um valor em que todos os reagentes eletroquimicamente ativos na superfície do eletrodo são completamente consumidos (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015).

Um voltamograma cíclico pode apresentar vários picos catódicos e anódicos devido a mecanismos de reações intrínsecos. Os parâmetros a seguir são usados para caracterizar o voltamograma cíclico de processos reversíveis (Andrienko, 2008; Bănică, 2012a; Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Gulaboski e Pereira, 2008; Kreysa, Ota e Savinell, 2014; Wang, 2000; Wu, Yuan e Wang, 2011):

- Se o processo em que ocorre a transferência de elétrons é mais rápido que a cinética do processo de transporte de massa (ou seja, difusão), então a reação que ocorre no eletrodo é eletroquimicamente reversível. Nesse caso, o potencial de separação de pico é definido como:

$$\Delta E_p = |E_{p,c} - E_{p,a}| = 2.303 \frac{RT}{nF} = 59/n \text{ mV em } 25^\circ\text{C} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: R é a constante universal do gás, T é a temperatura absoluta em Kelvin (K), n é o número de elétrons transferidos e F é a constante de Faraday. Assim, para uma reação redox reversível em 25°C com n elétrons, $\Delta E_p = 0.05916 / n \text{ V}$ ou cerca de 59 mV para um elétron. No entanto, devido à fatores como a resistência da célula, na prática esse valor é difícil de ser alcançado (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015);

- O raio da corrente de pico $|i_{pa}/i_{pc}| = 1$ em todas as varreduras;
- A função da corrente de pico $i_p/v^{1/2}$ (v = varredura) é independente de v ;
- A corrente de pico para um par eletroquimicamente reversível em 25°C é dado pela equação de Randles-Sevcik:

$$i_p = 2.686 \times 10^5 n^{3/2} AD^{1/2} v^{1/2} C^0 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde: i_p é a corrente de pico em ampères, n é o número de elétrons transferidos, A é a área do eletrodo (em cm^2), D é o coeficiente de difusão (em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), v é o potencial de varredura (em V s^{-1}) e C é a concentração das espécies eletroativas na solução (em mol cm^{-3}). Dessa forma, é possível explorar a VC com a finalidade de determinações quantitativas (Gulaboski e Pereira, 2008).

A VC é conferida de uma resposta bastante simples, como representado na Figura 7 para um sistema redox reversível como o do ferro-ferricianeto: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3} + e^- = \text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$, em que o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} . No voltamograma cíclico conferido pelo VC, os parâmetros importantes são os potenciais de pico (E_{pc} , E_{pa}) e correntes de pico (i_{pc} , i_{pa}) dos picos catódicos e anódicos, respectivamente, bem como do potencial formal (ou de meio pico) (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Kreysa, Ota e Savinell, 2014).

Enquanto que o potencial de meio pico (definido como a mediana entre E_{pa} e E_{pc}) fornece informação principalmente relacionada à termodinâmica, as magnitudes das correntes de pico demonstra a dinâmica envolvida na reação eletroquímica (Gulaboski e Pereira, 2008). O tipo de reação de eletrodo é dado pela forma do voltamograma cíclico, o qual também oferece o número de elétrons envolvidos na transformação eletroquímica (Bard *et al.*, 2001; Heinze, 1984).

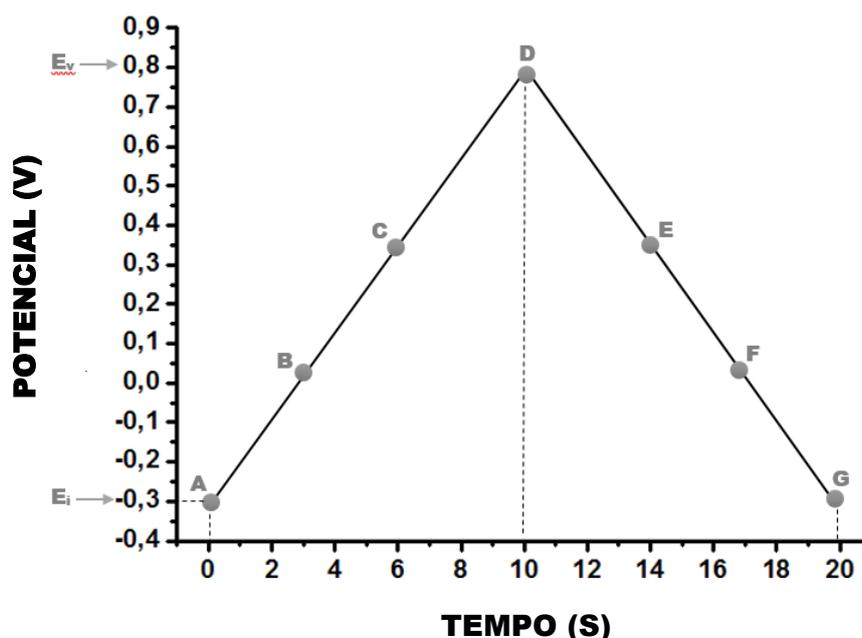
Para auxiliar na explicação da formação de um voltamograma cíclico, pode-se representar um processo de redução em um eletrodo, como:



Assim, em um experimento de VC, utilizando-se como exemplo a Fig. 7, o potencial é varrido linearmente com o tempo iniciando a partir de algum potencial inicial, E_i , onde a espécie eletroativa A é estável (não eletrorreduzida), para algum outro potencial, E_v , em que a transferência de elétrons entre a espécie A e o eletrodo é rápida, resultando na formação da espécie B. Por fim, o potencial é então varrido de volta para E_i , causando a transferência de elétrons

na direção oposta e a formação novamente de A (Compton, Laborda e Ward, 2014; Kissinger e Heineman, 1983; Kreysa, Ota e Savinell, 2014; Wang, 2000).

Figura 7 - Sinal de excitação potencial/tempo aplicado de um ciclo de um experimento de voltametria cíclica. No caso desse exemplo, o potencial inicial, E_i , é de -0,3 V, o potencial do vértice/topo, E_v foi de 0,8 V.



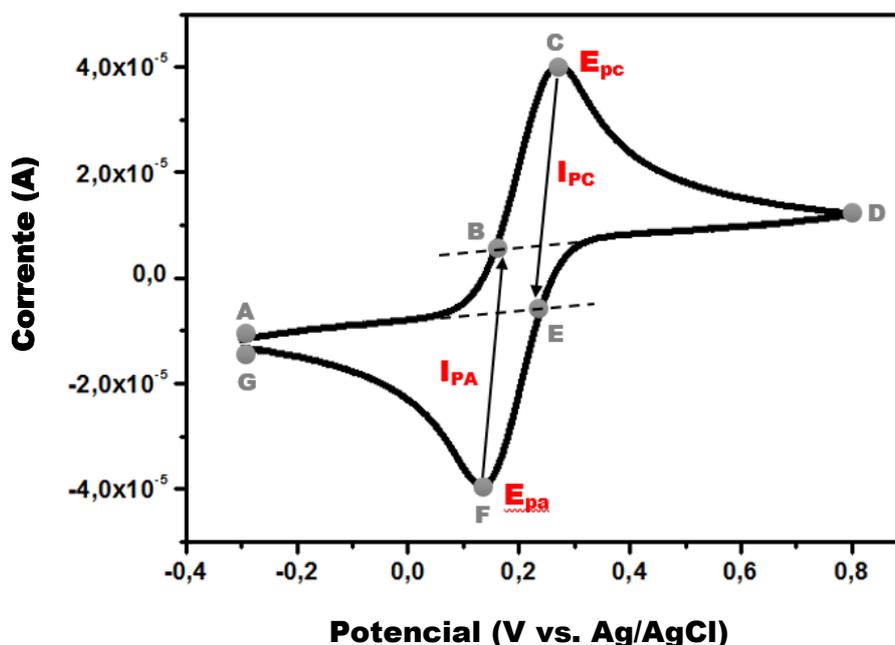
Fonte: autor próprio.

Através do processo descrito acima, a corrente I (proporcional à taxa de transferência de elétrons) é adquirida. Plotando um gráfico contendo a corrente em função do potencial, dará origem ao típico voltamograma cíclico de um eletrodo. Descritivamente, o potencial do ET é medido contra o eletrodo de referência que mantém um potencial constante, e o potencial resultante aplicado produz uma excitação de sinal. Os picos característicos de um voltamograma são causados pela formação da camada de difusão próxima a superfície do eletrodo (Scholz, 2010a; Wang, 2000).

A Figura 8 demonstra detalhadamente o que representa cada etapa que compõe um voltamograma cíclico, com as reações ocorrendo na superfície do ET, o qual cada ponto descrito também é visto na Figura 7.

O processo de redução ocorre de (A), que é o potencial inicial até (D), o potencial de troca. Nessa região, o potencial é varrido negativamente para causar uma redução. A corrente resultante é chamada de corrente catódica (i_{pc}), enquanto que o potencial de pico correspondente ocorre em (C) e é chamado potencial de pico catódico (E_{pc}). O E_{pc} é alcançado quando todo o substrato na superfície do eletrodo é reduzido. Depois que o potencial de troca é alcançado (D), o potencial é varrido positivamente de (D) a (G). Isso resulta na corrente anódica (i_{pa}), ocorrendo a oxidação. O potencial de pico em (F) é chamado de potencial de pico anódico (E_{pa}), que é alcançado quando todo o substrato na superfície do eletrodo tem sido oxidado (Compton, Laborda e Ward, 2014; Hammerich e Speiser, 2015; Kissinger e Heineman, 1983; Kreysa, Ota e Savinell, 2014; Marken, Neudeck e Bond, 2010).

Figura 8 - Voltamograma cíclico realizado em eletrodo de superfície de ouro de 3 mm de diâmetro em solução redox $Fe(CN)_6^{-3} + e^- = Fe(CN)_6^{-4}$. Eletrodo de referência Ag/AgCl (3 M KCl). E_{pc} : potencial de pico catódico; E_{pa} : potencial de pico anódico; I_{pc} : corrente de pico catódica; I_{pa} : corrente de pico anódica.



Fonte: autor próprio.

3.5 IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

Métodos de detecção para diversas finalidades são desenvolvidos diariamente, auxiliando tanto na vida pessoal quanto no ambiente clínico. Apesar do grande número de métodos existentes, muitos carecem de especificidade e sensibilidade, parâmetros importantes quando se há a necessidade de exatidão na detecção de algo. Assim sendo, a aplicação de técnicas utilizadas anteriormente para outras finalidades tem sido empregada objetivando a detecção rápida, sensível e específica de analitos das mais diversas naturezas, e para isso, existe o método da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

Técnicas eletroquímicas são utilizadas para determinar a concentração mínima de compostos, sendo aplicadas em sistemas biossensores, o qual se enquadram a VC discutida anteriormente, e a EIE, cuja discussão se dará no decorrer do presente capítulo. Embora as formas de medida que são independentes do tempo (estacionária) sejam as mais empregadas em células eletrolíticas sólidas, há também técnicas em que a excitação de sinal é tempo dependente, o qual se adequam a VC e EIE (Guth, 2014).

A resistência elétrica impede a fluxo da corrente direta através de um circuito elétrico. Em contraste, quando há a aplicação de correntes alternadas (CA) outros mecanismos impedem o fluxo da corrente em conjunto com a resistência. Dessa forma, o conceito de impedância elétrica (IE) pode ser aplicada, o qual é a grandeza física que quantifica a oposição de um capacitor para o fluxo de corrente alternada (Bănică, 2012b). Tal conceito foi introduzido por Oliver Heaviside dentre a década de 1880. Ademais, ele deu cunho às palavras indutância, capacitância e impedância e posteriormente inseriu esses conceitos no estudo de circuitos elétricos (Lvovich, 2012; Orazem e Tribollet, 2011).

Ao haver a aplicação de um potencial CA de pequena amplitude a uma célula eletroquímica e medir a corrente resultante através dessa célula, mede-se a impedância Z de um sistema. Por conseguinte, em analogia com a lei de

Ohm, a impedância Z de um sistema é o quociente da função potencial-tempo $V(t)$ e a função corrente-tempo $I(t)$, sendo expressa em unidades de resistência (Ω) (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Lisdat e Schäfer, 2008):

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \text{sen}(2\pi ft)}{I_0 \text{sen}(2\pi ft + \phi)} = \frac{1}{Y} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde V_0 e I_0 são os sinais máximos de potencial e corrente, f é a frequência, t é o tempo, ϕ é o ângulo de fase entre as funções potencial e corrente-tempo, e Y é o complexo de condutância ou admitância (Bănică, 2012b; Scholz, 2010a).

3.5.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), também chamada método de impedância de corrente alternada têm experimentado o crescimento de sua popularidade nos últimos anos. Sua aplicação inicial envolvia a determinação da capacitância de dupla camada (Delahay, 1965) e na polarografia de CA (Bauer, 1959). Devido a impedância ser usualmente determinada em diferentes frequências ao invés de apenas uma, o nome “espectroscopia” de impedância é utilizado. Dessa forma, um espectro de impedância permite não apenas a caracterização de interfaces, superfícies e camadas, mas também a de membranas, bem como processos de difusão e troca em processos de eletrodo (Alasia, 1999; Lisdat e Schäfer, 2008).

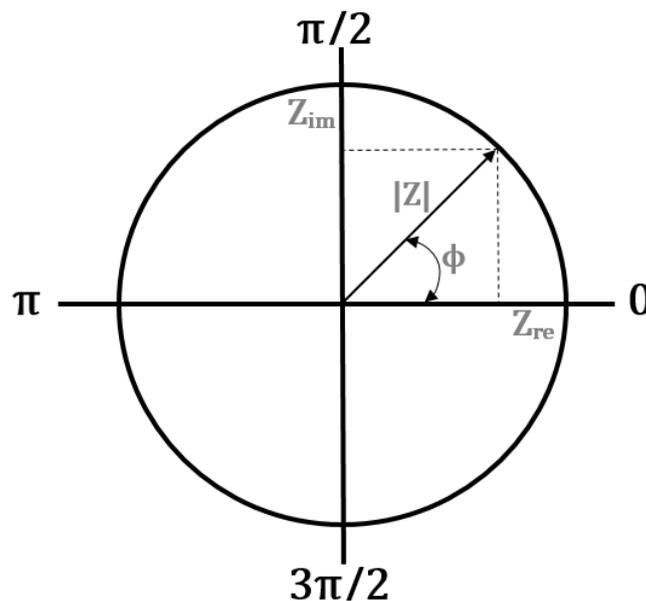
Em adição com as aplicações já citadas, a EIE é uma poderosa ferramenta em relevantes campos de aplicação, como a cinética de cargas e regiões interfaciais, podendo ser aplicadas a biossensores eletroquímicos; transferência de carga de condutores iônicos; eletrodos semicondutores, estudo de processos de inibição da corrosão de eletrodos; investigação de revestimento de metais, bem como a caracterização de dispositivos de estado sólido (Alasia, 1999; Chang e Park, 2010; Macdonald e Johnson, 2005; Ram *et al.*, 2016; Scholz, 2010a).

A impedância pode ser representada graficamente, recorrendo-se a relação de Euler a fim de expressar a dependência do ângulo de fase por meio de funções trigonométricas (Lvovich, 2014; Bănică, 2012), tendo como resultado:

$$Z = |Z|(\cos\phi + j \operatorname{sen}\phi) = Z_{re} + j Z_{im} \quad \text{Eq. 6}$$

A equação acima demonstra que a impedância é um valor complexo com os números real (Z_{re}) e imaginário (Z_{im}), que representam a projeção do módulo da impedância nos eixos de um sistema de coordenadas no plano cartesiano (Chang e Park, 2010; Kreysa, Ota e Savinell, 2014; Scholz, 2010b). Dessa forma, explica-se porque a impedância pode ser representada no plano complexo na forma de um vetor, o qual também pode ser chamado de fasor (Figura 9).

Figura 9 - Representação do vetor (fasor) da impedância Z mostrando as relações entre o complexo de impedância ($|Z|$), ângulo de fase (ϕ) e magnitude. Z_{re} e Z_{im} : eixo real e imaginário da impedância, respectivamente.



Fonte: autor próprio.

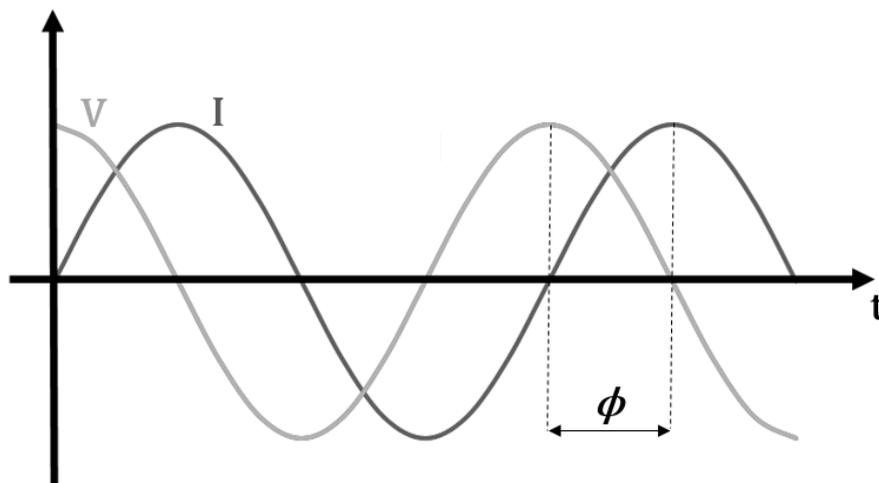
O valor absoluto ou módulo/magnitude da impedância pode ser expresso como representado abaixo. Assim sendo, tais cálculos definem o diagrama de Argand, também chamado diagrama complexo, sendo ele muito utilizado tanto

na matemática quanto na engenharia elétrica (Alasia, 1999; Macdonald e Johnson, 2005; Scholz, 2010b):

$$|Z| = \sqrt{(Z_{re} + j Z_{im})(Z_{re} - j Z_{im})} = \sqrt{Z_{re}^2 + Z_{im}^2} \quad \text{Eq. 7}$$

A corrente senoidal presente na EIE é resultante da aplicação de um potencial senoidal ao sistema, o qual por meio da avaliação da relação entre potencial aplicado e corrente, é obtido o ângulo de fase e a impedância do sistema (Bănică, 2012b; Damos, Mendes e Kubota, 2004), como pode se observar na Figura 10 (Bănică, 2012b; Damos, Mendes e Kubota, 2004).

Figura 10 - A impedância é um valor complexo, o qual a evolução do tempo de uma onda sinusoidal com determinada voltagem (V) que denota V em uma única frequência e corrente resposta (I), com determinado ângulo de fase (ϕ) que representa a defasagem da corrente em relação ao potencial que foi aplicado.



Fonte: autor próprio.

Por conseguinte, o ângulo de fase (ϕ) é descrito como a proporção dos componentes Z' e Z'' da impedância, em uma determinada frequência radial (Bănică, 2012b; Kreysa, Ota e Savinell, 2014; Orazem e Tribollet, 2011; Scholz, 2010b):

$$\tan \phi = \frac{Z_{im}}{Z_{re}} \quad \text{ou} \quad \phi = \arctan\left(\frac{Z_{im}}{Z_{re}}\right) \quad \text{Eq. 8}$$

3.5.2 Circuitos equivalentes

Com o objetivo de aproximar os dados experimentais de impedância, são utilizados circuitos equivalentes, que consistem de combinações de capacitores, resistores e indutores, além de outros componentes característicos de uma célula eletroquímica, distribuídos em série ou em paralelo (Bănică, 2012b; Lisdat e Schäfer, 2008). Diversos sistemas eletroquímicos são analisados de acordo com esse procedimento.

Um exemplo é o circuito equivalente modificado de Randles (Figura 11 b), que é um dos mais utilizados modelos para células em soluções aquosas, condutoras e iônicas. É empregado para organizar os dados da EIE, além de determinar os valores dos parâmetros elétricos para a concentração do analito ou amostra de escolha (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Kreysa, Ota e Savinell, 2014).

Sua estrutura compreende a resistência da solução (R_{Ω}) e uma combinação paralela da capacitância de dupla camada elétrica (C_{dl}) e resistência à transferência de carga (R_{ct}). Assim, os componentes real e imaginário da impedância Z para o circuito de Randles, são (Chang e Park, 2010; Damos, Mendes e Kubota, 2004; Scholz, 2010b):

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad \text{Eq. 9}$$

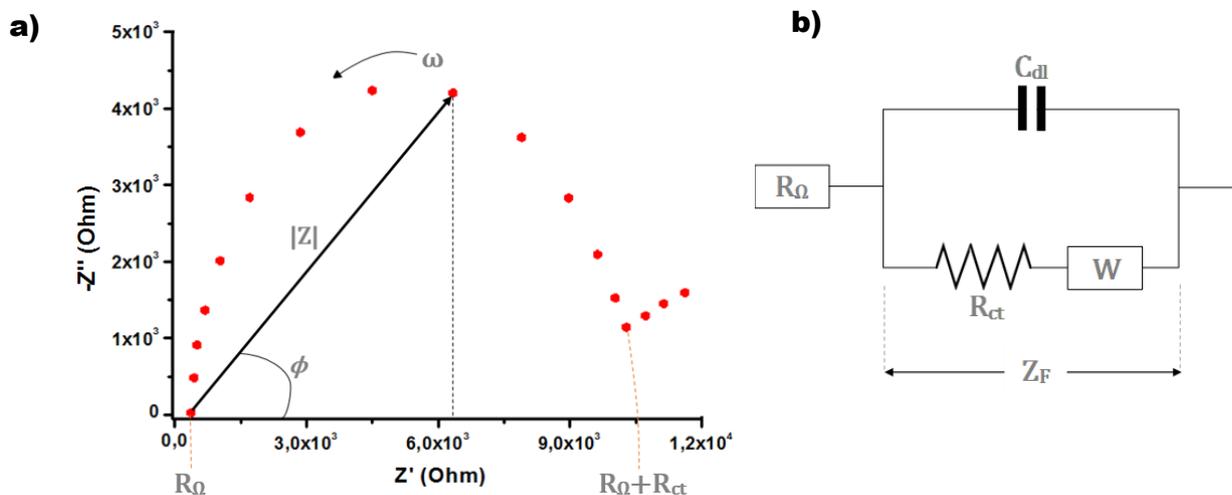
$$Z'' = \frac{\omega C_2 R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde: R_{Ω} – resistência intrínseca da solução; R_{ct} – resistência à transferência de carga; ω – frequência angular; C_{dl} – capacitância de dupla camada.

De modo que devido a frequência ser um parâmetro crucial, os dados de EIE são representados como o módulo da impedância vs. a frequência, tendo como objetivo obter um espectro de impedância (Bănică, 2012b). Logo, a representação de $-Z_{im}$ vs. Z_{re} demonstrada pelo diagrama de Nyquist, também chamado de diagrama de plano complexo (Figura 11 a) é utilizada.

Tal diagrama coloca em gráfico a impedância real (Z_{re} ou Z') no eixo-X e a impedância imaginária (Z_{im} ou $-Z''$) no eixo-Y. Ademais, é obtida uma representação da impedância em cada ponto disposto em gráfico. Ou seja, cada um desses pontos no diagrama é a impedância em uma frequência particular (Kreysa, Ota e Savinell, 2014; Lisdat e Schäfer, 2008; Scholz, 2010b).

Figura 11 - Diagrama de Nyquist (a) para o circuito equivalente de Randles (b). Z_W : impedância de Warburg e R_{ct} : resistência à transferência de carga, são acoplados em série para formar a impedância faradaica Z_F . Fonte: autor próprio.



Fonte: autor próprio.

3.6. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE ELETRODO: MONOCAMADAS AUTOMONTADAS

Objetivando o desenvolvimento de novas aplicações e inovação, interfaces modificadas têm ganho ampla atenção, principalmente no que diz respeito a monocamadas automontadas (MAM). Tanto o design quanto a criação de interfaces adequadas para determinadas finalidades fazem uso de MAM, que dispõem de fácil síntese.

Por apresentar benefícios como longa duração em superfícies, controle molecular, além do simples e rápido preparo, MAM se tornaram uma ferramenta valiosa no estudo e na aplicação de modificação de superfícies. Biomoléculas têm sido empregadas na criação de MAM, o qual sua estrutura determina a

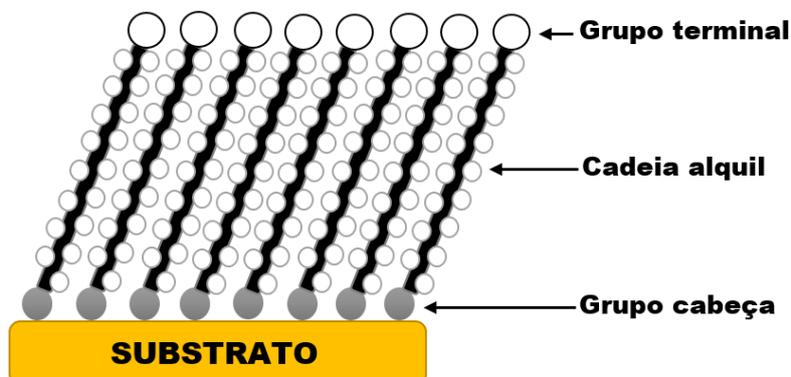
espessura da camada aplicada em uma determinada superfície, além de organização monomolecular e sua orientação. Tais características são essenciais para viabilizar a reprodutibilidade, durabilidade e precisão da MAM (Feliciano-Ramos *et al.*, 2010; Samanta e Sarkar, 2011).

MAM são simplesmente montagens ordenadas em duas dimensões que tem o pretexto de se formarem espontaneamente em uma ampla variedade de superfícies, por meio da adsorção de moléculas orgânicas na fase líquida ou gasosa (Ulman, 1996; Zhang, Cardona e Echegoyen, 2006). Apesar do primeiro trabalho envolvendo a síntese pioneira de uma camada monomolecular ser reportado da década de 40 (Bigelow, Pickett e Zisman, 1946), foi na década de 80 o qual o interesse em MAM se expandiu na área biotecnológica, através de um estudo envolvendo a formação de MAM de alcanotióis em superfície de ouro, cujo preparo se deu usando soluções de dialquil dissulfetos (Ferretti *et al.*, 2000; Nuzzo e Allara, 1983).

3.6.1 Estrutura e propriedades

Basicamente, a formação de filmes em monocamada se dá por meio de duas vias distintas: através da técnica de Langmuir-Blodgett, cujo filme pré-montado é transferido de uma interface ar-água para um substrato sólido (Ulman, 1991) e a produção de MAM por meio da montagem espontânea de uma substância anfifílica em um substrato, por meio da imersão (Fedorov e Mandler, 2016). Sua estrutura compreende basicamente três partes (Figura 12): um grupo cabeça superfície-ativo, tendo o papel de se ligar fortemente ao substrato; uma cadeia alquil que dará estabilidade à montagem da monocamada por meio de interações de van der Waals e funcionalidade com papel importante no acoplamento de uma biomolécula a uma monocamada conferida pelo grupo terminal (Allara, 1995; Arya *et al.*, 2009; Gschneidner e Moth-Poulsen, 2015).

Figura 12 - Representação esquemática da estrutura de uma monocamada automontada em um substrato como a superfície de ouro de um eletrodo. Fonte: autor próprio.



Fonte: autor próprio.

Muitos estudos comprovaram que há diversas possibilidades de formação de MAM, compreendendo diversos sistemas de substâncias e substratos. Há destaque para MAM formadas por ácidos carboxílicos de cadeia longa em substratos de óxido metálico (Lang, Mottaghi e Lacaze, 2016); organossilanos em substratos hidroxilados como o vidro, óxido de alumínio e silicone (Li, Z. *et al.*, 2016); e espécies organosulfuradas em superfícies de metais nobres.

O desenvolvimento de MAM em metais nobres tais como ouro, prata, platina, cobre e paládio utilizando compostos organosulfurados como cisteína (Cys), cisteamina e ácido 4-mercaptobenzoico por exemplo, são os mais utilizados e estudados. Tal destaque se dá devido a sua marcada estabilidade e propriedades físico-químicas (Ferretti *et al.*, 2000; Samanta e Sarkar, 2011).

Apesar da ampla possibilidade de escolha de substratos, o ouro denota-se como o melhor e mais apropriado. Essa notoriedade é baseada em importantes características do ouro, como: ser um metal inerte o qual não há a formação de óxidos estáveis em sua superfície, além de dispor de uma forte e específica interação com o enxofre. Devido a essas particularidades, o ouro permite a formação de monocamadas mais estáveis, reproduzíveis e em um curto espaço de tempo (Atta, Galal e El-Ads, 2012; Galal, Atta e El-Ads, 2012; Moccelini, Fernandes e Vieira, 2008).

Dessa forma, o uso de compostos que contém enxofre em sua estrutura como alcanotióis, dialquil-dissulfuretos e dialquil-sulfuretos, que possui elevada

afinidade por superfícies de metais nobres como o ouro, são empregados no preparo de MAM (Ferretti *et al.*, 2000). Alcanotióis organosulfurados possuem um mecanismo de ligação à superfície do ouro, o qual ocorre uma quimissorção espontânea, ocasionando a perda do hidrogênio do grupo tiol como o hidrogênio molecular H_2 (Duwez, 2004), convertendo-se em uma forte, covalente e termodinamicamente favorecida ligação S-Au (enxofre-ouro) (Gschneidner e Moth-Poulsen, 2015).

O controle da propriedade de interfaces é um fator importante para a finalidade o qual a MAM será aplicada, pelo fato de que interfaces que contém pelo menos uma superfície polimérica serem irregulares. Logo, MAM são consideradas uma das principais escolhas quando se diz respeito ao estudo de fenômenos interfaciais, devido a sua capacidade de controle da concentração de determinado grupo funcional em sua superfície. Assim, utilizando como exemplo uma superfície de ouro para a formação de MAM, o tiol terminal tem a capacidade de acomodar grupos funcionais -OH, -COOH e -NH₂, que podem ser facilmente manipulados, tornando a técnica compatível para a aplicação desejada (Arya *et al.*, 2009; Samanta e Sarkar, 2011; Ulman, 1996).

3.6.2 Aplicações

Características como simplicidade do método de formação; reprodutibilidade e flexibilidade de síntese nos mais variados tipos de superfícies; emprego de uma variedade de técnicas para a caracterização da superfície modificada, além das demais qualidades já citadas em junção a sua escala nanométrica, levou a aplicação da MAM para diversas áreas da ciência e nanotecnologia, incluindo microeletrônica (Bernasconi *et al.*, 2016), biotecnologia (Lyubarskaya, 2014), ciência de materiais (Kim *et al.*, 2015), super-redes (Paik *et al.*, 2015), lubrificantes (Paul *et al.*, 2016), além da promissora área de biossensores (Aliofkhazraei e Makhlof, 2016).

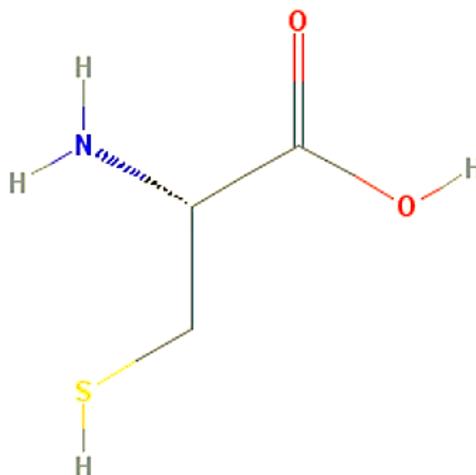
A fabricação e design de interfaces adequadas para o reconhecimento molecular e transdução de sinal são fatores essenciais para o desenvolvimento

de biossensores, cujas características como alta sensibilidade e rapidez na análise da resposta se apresentam de forma marcante. Para isso, a estabilidade, estrutura uniforme e simplicidade no processo de variação de espessura da monocamada torna a MAM como alternativa no campo de biossensores (Mizutani, 2008). Seu uso explica-se pela sua excelente integração com o elemento de reconhecimento biológico, que entrará em contato com o analito em questão (Samanta e Sarkar, 2011).

O emprego de MAM em biossensores alcançou um patamar elevado, tal que pode ser comprovado na literatura através de vários biossensores criados que possuem variados modos de transdução de sinal, utilizando-se de uma pequena quantidade de molécula orgânica diluída em solução para sintetizar a monocamada automontada e finalizar na detecção de determinado analito (Arya *et al.*, 2009). Os principais exemplos envolvem a criação de biossensores enzimáticos (Mossanha *et al.*, 2015); imunossensores (Ouerghi *et al.*, 2016); genossensores (Ren *et al.*, 2016) e biossensores de microrganismos como bactérias (Yang *et al.*, 2016); fungos (Yodmongkol *et al.*, 2016) e vírus (Katayama *et al.*, 2016).

3.6.3 Cisteína

Existe na literatura vários tipos de MAM formadas por compostos que possuem o grupamento tiol (-SH) em sua estrutura, no qual muitas de suas aplicações envolveram o desenvolvimento de biossensores. Alguns exemplos enquadram o ácido 3-mercaptopbenzóico (Kumeria e Santos, 2015); ácido 16-mercaptophexadecanóico (Radhakrishnan *et al.*, 2016); 4-mercaptopiridina (Ding *et al.*, 2015); tionina (Ma *et al.*, 2015); homocisteína (Li *et al.*, 2015); cisteamina (Ouerghi *et al.*, 2016) e cisteína (Cys) (Figura 13) (Mukdasai *et al.*, 2016).

Figura 13 - Estrutura da cisteína.

Fonte: PubChem.

Cys ($\text{HS-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$) é um aminoácido tiolado de baixo peso molecular envolvido em diversas funções celulares importantes, como a síntese de proteínas, detoxificação e metabolismo (Hassan, El-Baz e Abd-Rabboh, 2007). Sua estrutura contendo grupamento carboxila, amina e tiol, a torna como um excelente alvo em inúmeras pesquisas por suas múltiplas funcionalidades. Contendo um pK_a de valor 1.71, 8.33 e 10.78, Cys é considerada excelente na pesquisa de sensores e biossensores bioquímicos e eletroquímicos (Atta, Galal e El-Ads, 2012; Gondikas *et al.*, 2012). A cadeia lateral da Cys composta pelo grupamento tiol é não-polar, classificando-a assim como hidrofóbica. Esse fator é primordial, pois permite que essa molécula interaja com diferentes espécies químicas (Galal, Atta e El-Ads, 2012; Mukdasai *et al.*, 2016).

Aminoácidos têm sido usados na biofuncionalização de superfícies de ouro, principalmente devido a presença de grupos funcionais como -SH e -NH₂. Cys tem a capacidade de formar MAM por meio de adsorção espontânea, de forma simples e rápida em superfícies metálicas como ouro, prata, cobre, platina, etc., sendo a adsorção em ouro, a melhor (Galal, Atta e El-Ads, 2012; Mocanu *et al.*, 2009).

Apesar de seu grupo tiol fazer a ligação covalentemente ao ouro via desprotonação para se obter a monocamada automontada, há a possibilidade

de interação não-equivalente e não-covalente com o ouro, sendo elas através do grupo carboxila e amina (Häkkinen, 2012). Correlacionada com os demais exemplos de compostos tiolados, Cys tem um custo mais acessível, além de ser mais estável como agente formador de MAM (Patil *et al.*, 2014; Qingwen *et al.*, 2001).

3.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO

A nanotecnologia e o mundo da nanociência têm se provado atrativos e ferramentas promissoras no seu uso aplicado ao diagnóstico e tratamento na medicina milenar e moderna, apresentando-se como uma das áreas de mais progresso na pesquisa científica. Nanotecnologia define-se como a criação de materiais, dispositivos e sistemas funcionais através do controle da matéria entre a escala 1-100 nm (Boisselier e Astruc, 2009; Wang, 2005).

Materiais como dendrímeros, lipossomas, micelas, nanopartículas poliméricas sintéticas, substâncias inorgânicas, nanopartículas metálicas entre outros exemplos, por disporem de tamanho em nanoescala, apresentam propriedades físico-químicas únicas extremamente úteis, oferecendo um mundo de possibilidades e aplicações (Garrido *et al.*, 2015).

Propriedades peculiares podem ser vistas a depender do tamanho e composição dessa nanopartícula. Alguns exemplos são o confinamento quântico em cristais semicondutores, ressonância de plásmons em NPs metálicas e o superparamagnetismo característico de materiais magnéticos (Doria *et al.*, 2012).

A literatura aponta a existência e variedade de nanopartículas metálicas, o qual as mais comumente estudadas são as de ouro (Daraee *et al.*, 2014), prata (Panáček *et al.*, 2016), óxido de titânio (Ou *et al.*, 2016) e ferro (Tesh e Scott, 2016). Entre os mencionados, nanopartículas de ouro (AuNPs) têm se mostrado a mais promissora, não apenas pelo seu uso em várias fases da história, maior estabilidade química em solução e compatibilidade biológica, mas também

principalmente devido às mais diversas aplicações que surgem diariamente em diversas áreas da ciência, tecnologia e inovação (Chen, Mwakwari e Oyelere, 2008; Dreaden *et al.*, 2012).

3.7.1 Breve histórico

A extração do ouro teve início em Varna, na Bulgária, com registros datados de 5 mil anos A.C. Teve seu auge principalmente no Antigo Egito por volta de 1200-1300 A.C. com uma extração chegando a 10 toneladas por ano. Em relação ao ouro coloidal, a conhecida Taça de Licurgo, datada do quarto ou quinto século D.C. estima que o uso de AuNPs teve início bem antes disso, não apenas no Egito, mas também na China, Arábia e Índia. Sua aplicação ultrapassava os propósitos estéticos pois também já era reportado naquele tempo o uso dessas nanopartículas com finalidade curativa (Boisselier e Astruc, 2009; Daniel e Astruc, 2004).

O uso do ouro na medicina, também chamado crisoterapia, já era datado desde a antiguidade em culturas ancestrais do Egito, China e Índia utilizavam para tratar doenças como varíola, úlceras de pele e sífilis (Corti e Holliday, 2009). Na Idade Média, Paracelso desenvolveu AuNPs sintetizadas pela redução do cloreto áurico com álcool e óleo de extrato de plantas para uso em desordens mentais. No fim do século XIX e início do século XX, o ouro coloidal era usado por injeção intravenosa para o tratamento do alcoolismo, além do tratamento da tuberculose (Wilson, 2008). O primeiro livro que descreve a síntese e uso médico de AuNPs data de 1618, publicado pelo filósofo e médico Francisco Antonii (Dykman e Khlebtsov, 2012).

3.7.2 Síntese

Os métodos de síntese de nanopartículas metálicas são os mais diversos, podendo-se separar em síntese física (ablação a laser, deposição a vapor,

esmerilhamento, etc.) e química (redução química, redução fotoquímica, coprecipitação, hidrólise, decomposição termal, etc.), objetivando, assim, obter NPs homogêneas e com tamanho e forma específica, além de propriedades de superfície. Tais características entre nanopartículas as fazem úteis pela variedade de propriedades físico-químicas que elas fornecem (Doria *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2012).

O tamanho das AuNPs é determinado principalmente pela concentração do sal, temperatura e a taxa de adição de reagentes. Todos esses fatores resultam em um ouro coloidal de 10-25 nm, o qual, variando esses fatores, é possível obter nanopartículas de 1-100 nm (Tiwari *et al.*, 2011). O método mais utilizado para se obter AuNPs esféricas é a redução do Au(III) a íons Au(0) utilizando sal de ouro como o ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) com o citrato como agente redutor. Tal método foi desenvolvido por Turkevich (Turkevich, Cooper e Hillier, 1951), e posteriormente otimizado por Frens (Boisselier e Astruc, 2009; Frens, 1973).

Outro método que tem destaque na literatura é o proposto por Brust-Schiffrin, o qual AuNPs de ~2 nm são sintetizadas, o qual uma solução aquosa de íons de ouro é transferida para uma fase orgânica seguida pela redução do borohidreto (Brust *et al.*, 1994). Essa técnica foi inspirada pelo sistema de duas fases de Faraday, utilizando o ligante tiol que se liga fortemente ao ouro, resultando em uma das menores e estáveis AuNPs existentes (Daniel e Astruc, 2004).

Brown e Natan submeteram a síntese de nanopartículas de diâmetro 30-100 nm baseando-se no uso da superfície das AuNPs como agentes catalisadores para a redução do Au(III) pela hidroxilamina (Brown e Natan, 1998). Posteriormente Murphy e colaboradores, objetivando controlar tamanho e forma do ouro coloidal, misturaram AuNPs já reduzidas com borohidreto em uma solução com sal de ouro e surfactantes, utilizando o ácido ascórbico como agente redutor, produzindo AuNPs monodispersas em grande quantidade (Jana *et al.*, 2001).

Ademais, outros métodos também são utilizados, como a redução física, obtendo AuNPs ocas (Sun, Mayers e Xia, 2003); redução fotoquímica, resultando em NPs cúbicas (Kundu *et al.*, 2007); redução biológica, em que utilizam-se hidrogéis moleculares de peptídeos anfifílicos produzindo diversas formas de AuNPs (Mitra e Das, 2008) e técnicas de evaporação de solvente, originando super redes de ouro em 2D (Pyrpassopoulos *et al.*, 2007). Com o passar dos anos, novas técnicas de síntese e aprimoramentos das já existentes têm sido estudadas, denotando fácil fabricação, além das singulares propriedades físico-químicas a elas atribuídas (Chen, Mwakwari e Oyelere, 2008).

3.7.3 Propriedades físico-químicas

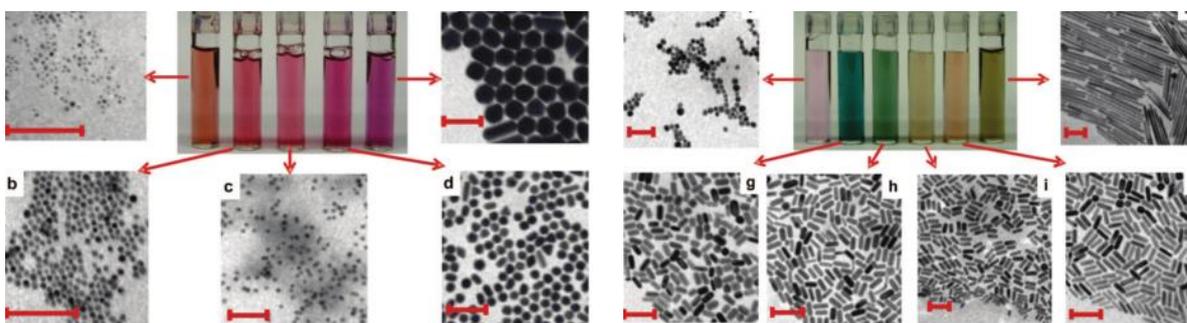
AuNPs apresentam uma variedade de características eletrônicas, ópticas, químicas e biológicas que podem ser exploradas em aplicações químicas, bioanalíticas e biomédicas. A adequação do tamanho, forma e ajustes por meio de funcionalizações de sua estrutura e superfície alteram as propriedades físico-químicas, cujas variações se mostram essenciais para se alcançar o êxito para uma específica finalidade.

A forma esférica das tradicionais AuNPs, por exemplo, possuem propriedades optoeletrônicas (Sau *et al.*, 2010), excelente biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (Boisselier e Astruc, 2009) e elevada razão superfície-volume, o qual a frequência de plásmons é estranhamente sensível à natureza dielétrica de sua interface com o meio local (Benetti *et al.*, 2013). Havendo qualquer mudança nos arredores dessas NPs, como modificação de superfície e agregação, acarretará em mudanças colorimétricas na dispersão coloidal (Murphy *et al.*, 2008).

Uma importante propriedade física atribuída ao ouro coloidal (Figura 14) é a supressão (*quenching*) da fluorescência e ressonância de plásmons de superfície, ocasionada pela irradiação com a luz em determinadas frequências que resulta em uma oscilação coletiva de elétrons (Eustis e el-Sayed, 2006). AuNPs esféricas exprimem uma múltipla variação de cores quando estão em

solução aquosa, à medida que há a variação de tamanho entre 1-100 nm (como marrom, laranja, rosa, vermelho, roxo e seus intermediários), além de mostrar mudança de cores também quando há alternância da forma das AuNPs (Murphy *et al.*, 2008; Njoki *et al.*, 2007).

Figura 14 - Imagens de soluções de nanopartículas de ouro esféricas (esquerda) e em formas variadas (direita), como função o aumento de seu tamanho ou dimensões, indicado pela variação das cores obtidas da solução coloidal. As escalas em vermelho correspondem a 100 nm.



Adaptado de Murphy *et al.*, 2008.

O pico de absorção de AuNPs esféricas apresenta uma relação tamanho-dependente, variando entre 500-550 nm. Essa faixa de absorção surge pela oscilação coletiva de elétrons devido à excitação ressonante de fótons incidentes, também conhecido como banda de plásmons de superfície (Ghosh e Pal, 2007; Orendorff, Sau e Murphy, 2006). Tal fenômeno é influenciado não unicamente pelo tamanho, mas também por qualquer variação de forma, solvente, ligante de superfície, carga do núcleo e temperatura, além de mostrar mais sensível quando próxima à outras nanopartículas (Doria *et al.*, 2012; Yeh, Creran e Rotello, 2012).

A funcionalização de nanopartículas é uma das formas mais utilizadas para modificar suas propriedades físico-químicas, permitindo aumentar sua aplicabilidade. A funcionalização de AuNPs com pequenas moléculas ou polímeros é um passo essencial para o desenvolvimento de novos materiais (Blakey *et al.*, 2010; Mout *et al.*, 2012).

3.7.4 Aplicações biomédicas

Em resumo, quando comparada com outros tipos de nanomateriais para aplicações gerais, as AuNPs ganham destaque principalmente pela síntese fácil, rápida e reprodutível; modificação de superfície baseada na formação da ligação Au-S altamente estável; tamanho, forma e estado de agregação, além da marcante biocompatibilidade e biossegurança e excelentes propriedades físico-químicas (Zhou *et al.*, 2015). Todos esses atributos excepcionais permitem que pesquisadores desenvolvam aplicações diversas, passando por áreas como entrega de drogas e outras moléculas, bioimagem, terapias e diagnóstico (Kumar e Roy, 2016; Yeh, Creran e Rotello, 2012).

Pesquisas comprovaram que AuNPs proporcionam excelente biodistribuição em tumores, fazendo com que houvesse a criação de nanossistemas com AuNPs para o veículo e distribuição de agentes quimioterápicos (Giljohann *et al.*, 2010). Tal avanço na área faz com que haja a diminuição de efeitos colaterais, baixa toxicidade e melhoria da eficiência terapêutica, todos esses fatores culminando também com a solução de problemas como solubilidade, estabilidade e farmacocinética das drogas utilizadas (Ahmed *et al.*, 2014; Daraee *et al.*, 2014; Li Volsi *et al.*, 2016).

Os agentes convencionais utilizados nas técnicas de imagem como lantanídeos e fluoróforos orgânicos dispõem de problemas como serem propensos ao fenômeno de *photobleaching* e baixo rendimento quântico, e as AuNPs aparecem como agentes alternativos de contraste (Chen, Mwakwari e Oyelere, 2008; Ge *et al.*, 2016; Wolfbeis, 2015).

AuNPs tem absorção máxima na região visível ou próxima do infravermelho, e quando é irradiada com uma luz correspondente, fica extremamente quente. Com isso, conjugando-se AuNPs com anticorpos ou outras moléculas, permite-se assim a ligação específica delas no interior ou ao redor das células-alvo, ocasiona a morte do tecido tumoral (Dykman e Khlebtsov, 2012). Por conseguinte, o uso de AuNPs também é retratado em terapias de câncer e outras doenças, por meio da terapia plasmônica fototermal e fotodinâmica (Lucky, Soo e Zhang, 2015; Rengan *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016).

No diagnóstico clínico as AuNPs têm sido empregadas veementemente para a detecção de biomoléculas alvo. No biodiagnóstico, as principais abordagens que fazem uso de AuNPs envolvem: (1) funcionalização de superfície das AuNPs que promovem *nanoprobes* altamente seletivos; (2) distância interdependente das AuNPs para testes de sensibilidade colorimétrica para específica hibridização de DNA, indicando assim a detecção de sequências de ácidos nucleicos específicos em amostras biológicas e (3) métodos eletroquímicos para proporcionar o aprimoramento de sinal (Baptista *et al.*, 2008; Boisselier e Astruc, 2009; Nicol, Dixon e Coulter, 2015).

A literatura dispõe de muitos exemplos de métodos de diagnóstico com ouro coloidal. Alguns deles através da funcionalização da superfície das AuNPs envolvem a detecção de doenças como câncer (Patskovsky *et al.*, 2015); hepatite (Shourian, Ghourchian e Boutorabi, 2015); HIV (Ly, Park e Park, 2016); Alzheimer (Georganopoulou *et al.*, 2005) etc. Os métodos de diagnóstico através da hibridização de fragmentos de DNA são utilizados principalmente como *probes* de fluorescência, além de na simples mudança da cor da solução com alteração do pico de absorção, indicarem a hibridização confirmando determinada doença na amostra clínica (Shamsipur *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016, 2015).

3.7.5 Aplicação em biossensores

Biossensores utilizam moléculas como enzimas, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos para promover o reconhecimento biológico ou para seguir o curso de qualquer fenômeno biológico de interesse, e com isso, as AuNPs aplicadas a essas moléculas na plataforma biossensora promovem o auxílio e melhoria na detecção (Chen, Mwakwari e Oyelere, 2008; Tiwari *et al.*, 2011).

O campo da eletroquímica analítica almeja pelo desenvolvimento de biossensores eletroquímicos com a capacidade de promover melhores características analíticas, como sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, fácil fabricação e baixo custo. A nanotecnologia já se provou promissora e

inovadora nessa área, o qual vasto uso de nanomateriais é aplicado e a procura e criação de outros tipos tem alavancado o mercado buscando nanomateriais que alavancassem a resposta do biossensor. A literatura tem provado que AuNPs são uma excelente escolha (Pingarrón, Yáñez-Sedeño e González-Cortés, 2008; Saha *et al.*, 2012).

Biossensores eletroquímicos produzidos através do acoplamento da molécula de reconhecimento biológico com AuNPs, tendo sua interpretação realizada por transdutores eletroquímicos tem adquirido amplo interesse na pesquisa com biossensores nos últimos anos (MacKay *et al.*, 2015). Destacam-se três maneiras de modificar a superfície de um eletrodo com AuNPs: (1) deposição direta das nanopartículas no eletrodo; (2) incorporando o ouro coloidal misturando-o com outros componentes na matriz do eletrodo e (3) através da ligação das AuNPs modificadas com grupos funcionais formando monocamadas automontadas (Yáñez-Sedeño e Pingarrón, 2005).

Quando aplicadas aos biossensores, AuNPs apresentam excelentes e singulares propriedades físico-químicas, tais como elevada razão superfície-volume, ampla energia de superfície e força mecânica, biocompatibilidade, ressonância de plásmos de superfície localizada, propriedades ópticas não-lineares, além da habilidade de agir como um caminho de condução elétrica entre os componentes da plataforma sensora e a superfície do eletrodo (Liu, Leech e Ju, 2003; Zhou *et al.*, 2015). Portanto, tais propriedades têm sido exploradas no ato do reconhecimento biológico que culmina em sinais elétricos ou transduções eletroquímicas (Cao, Ye e Liu, 2011).

Essas abordagens elétricas e eletroquímicas propostas pelas AuNPs geralmente dependem das mudanças na resposta ôhmica de um circuito elétrico ou o fluxo de elétrons criado de um processo faradaico como a oxidação ou redução próxima a superfície de um eletrodo para alcançar a biossensibilidade (Doria *et al.*, 2012). Apesar de ser possível a detecção direta do analito elétrica ou eletroquimicamente, muitos são os benefícios do uso conjugado do biossensor com AuNPs devido a suas propriedades eletroativas e catalíticas, aumentando consideravelmente a sensibilidade do biossensor. Ademais, há a possibilidade de adição de biomoléculas ao ouro, como peptídeos, podendo

desempenhar o papel de elemento biológico ativo na detecção de determinado analito (Andrade *et al.*, 2015; Li, Schluesener e Xu, 2010; Wittenberg e Haynes, 2009).

3.8 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

O aumento da resistência a antimicrobianos determinou um problema de saúde pública mundialmente com o crescente número de doenças infecciosas que se tornaram cada vez mais difíceis de tratar. Tal problema estimulou uma busca para novas opções de agentes contra esses microrganismos resistentes a antibióticos convencionais.

Apesar da criação de medidas preventivas contra a resistência bacteriana, tornou-se necessária e urgente a busca para novas alternativas. Essa situação deu oportunidade para uma variedade enorme de opções que poderiam ser aplicadas para agir contra esses patógenos, o qual podem apresentar uma ação mais eficaz e rápida quando comparado com a criação de novos medicamentos pela indústria farmacêutica que implicariam com a continuidade e agrave da resistência (Hassan *et al.*, 2012).

A seletividade de muitos peptídeos antimicrobianos (PAM) e seu modo de ação singular, tornou-os candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antibióticos (Dathe e Wieprecht, 1999). PAMs apresentam toxicidade seletiva preferencial a células microbianas, tornando-os não-tóxicos para células de mamíferos, como hemácias e leucócitos (Peters, Shirliff e Jabra-Rizk, 2010)

A Tabela 1 descreve os principais PAMs e suas diversas atividades, dentre as quais se destaca sua ação antibiótica. Embora apresente tamanho, composição de aminoácidos e estrutura secundária variável, todos esses peptídeos tem a capacidade de assumir uma conformação anfipática de ligação a membranas celulares. Estudos apontam que eles podem alcançar sua atividade antimicrobiana através de numerosos processos celulares (Nguyen, Haney e Vogel, 2011).

Tabela 1. Lista dos principais PAMs estudados na literatura, local onde o peptídeo é isolado e suas respectivas atividades.

PAM	Hospedeiro	Atividade
Clavaninas	Tunicado marinho: <i>Styela clava</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antifúngica e antibiofilme
Cecropinas	Inseto: <i>Hyalophora cecropia</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antiviral; antimalárica; antiparasitária; ação contra células tumorais
Melitina	Mel e veneno: <i>Apis mellifera</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antiviral (HIV); antifúngica; antiparasitária; ação contra células tumorais
Magaininas	Anfíbio: <i>Xenopus laevis</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antifúngica
Fowlicidinas	Aves: <i>Gallus gallus</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antibiofilme
Tanatina	Inseto: <i>Podisus maculiventris</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas
Protegrinas	Mamífero: <i>Sus scrofa domesticus</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; antibiofilme; ação antiviral (HIV); antifúngica; ação contra células tumorais
Defensina VrD2	Planta: <i>Vigna radiata</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas e ação antifúngica
Plectasina	Fungo: <i>Pseudoplectania nigrella</i>	Bactérias Gram positivas; ação antiviral e antifúngica
Defensina A	Inseto: <i>Protophormia terraenovae</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas
α -Defensina	Mamífero: <i>Homo sapiens</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antiviral (HIV); antifúngica; antiparasitária; inibidor enzimático; ação cicatrizante; ação contra células tumorais
β -Defensina	Mamífero: <i>Homo sapiens</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; antibiofilme; ação antiviral (HIV); antifúngica; ação cicatrizante
θ -Defensina	Mamífero: <i>Macaca mulatta</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antiviral (HIV); antifúngica
Indolicidina	Mamífero: <i>Bos taurus</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; antibiofilme; ação antiviral (HIV); antifúngica
Tritrpticina	Mamífero: <i>Sus scrofa domesticus</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação antifúngica
Catelicidina LL-37	Mamífero: <i>Homo sapiens</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; Ação antibiofilme; antiviral; antifúngica; antiparasitária; inibidor enzimático; ação cicatrizante; ação contra células tumorais
PR-39	Mamífero: <i>Sus scrofa domesticus</i>	Bactérias Gram positivas e Gram negativas; ação cicatrizante e ação contra células tumorais
Colicinas	Bactéria: <i>Escherichia coli</i>	Bactérias Gram negativas

Fonte: Todas ações descritas foram obtidas pelo APD3 (Antimicrobial Peptide Database - <http://aps.unmc.edu/AP/>).

PAM são considerados componentes essenciais do sistema imune inato e mecanismo de defesa de uma vasta gama de animais, insetos e plantas. Os PAM foram isolados pioneiramente na década de 70 em moscas do gênero *Drosophila*, através da obtenção das cecropinas (Boman, Nilsson e Rasmuson, 1972), e isso impulsionou o crescimento de pesquisas relacionadas a PAM, permitindo descobertas nos anos posteriores das α -defensinas humanas e magaininas (Wang, Li e Wang, 2016).

PAM tem sido isolados de organismos de variados reinos, como o Animalia (mamíferos, insetos, répteis, anfíbios, peixes); Plantae (diversas espécies de plantas); Fungi (leveduras); Protista (algas e protozoários) e Monera (eubactérias, compreendendo bactérias Gram positivas e Gram negativas) (Brogden e Brogden, 2011; Maróti Gergely *et al.*, 2011). Possuem cerca de 10-50 aminoácidos em sua estrutura, dispoendo de carga positiva e uma proporção substancial de resíduos hidrofóbicos de cerca de 30% (Hancock e Sahl, 2006).

Em adição, além de apresentarem uma ação vasta e muito reconhecida na ruptura de membranas celulares bacterianas ocasionando a lise, PAM também exibem ação contra outros microrganismos como fungos e protozoários, ação antiviral e também atuam contra endo e exoparasitas e dispõem de atividade anticâncer contra células tumorais (Carneiro *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2013; Parachin *et al.*, 2012).

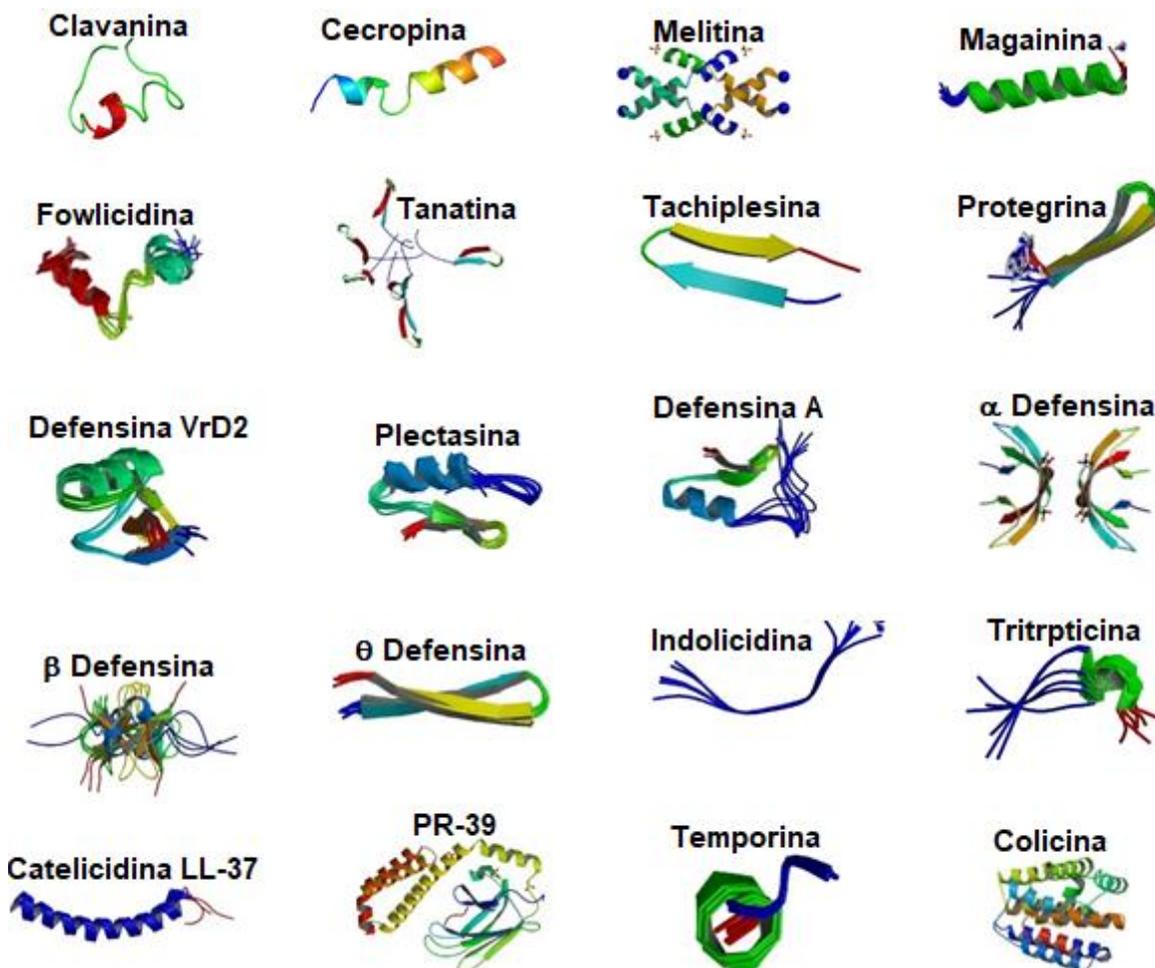
Peptídeos são biomoléculas formadas por ligações entre resíduos de aminoácidos, em sua grande maioria, apresentando caráter hidrofóbico. Apesar de peptídeos naturais exibirem cargas positivas, eles também podem apresentar cargas neutras ou negativas de acordo com o pH da solução ao qual eles se encontram (Van Kan *et al.*, 2002). Em solução livre, alguns peptídeos apresentam estruturas secundárias e terciárias, enquanto outros não apresentam estrutura definida. Entretanto, eles podem se dobrar em uma estrutura anfipática quando entram em contato com a barreira lipídica de uma célula alvo (Carneiro *et al.*, 2015). A maioria dos PAM apresentam uma estrutura α -hélice anfipática de caráter catiônico, contudo, também há estruturas α -hélice hidrofóbicas ou mesmo levemente aniônico, de modo que tais características

permitem a interação da superfície de microrganismos para executar atividade antimicrobiana (Nguyen, Haney e Vogel, 2011).

3.8.1 Tipos e características estruturais

Baseado em suas estruturas (Figura 15), os PAM podem ser classificados em quatro grupos: α -hélice, β -folha, estrutura em loop e estrutura de peptídeo estendido (Hancock e Sahl, 2006; Seo *et al.*, 2012). Os PAM α -hélice como as clavaninas, magaininas e cecropina estão entre os PAM mais estudados na literatura. Embora esses peptídeos sejam caracterizados por sua estrutura, a sua citotoxicidade é provida essencialmente por tender a formação da α -hélice que pode apresentar uma superfície mais hidrofóbica (Takahashi *et al.*, 2010).

Figura 15 - Estrutura tridimensional dos principais peptídeos antimicrobianos descritos na literatura.



Fonte: PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>).

Os comprimentos exibidos pela α -hélice são suficientemente grandes para abranger a espessura de bicamadas lipídicas de membrana, exibindo desemparelhamentos entre a porção hidrofóbica da hélice e o núcleo lipídico acil, influenciando fortemente nos movimentos laterais e orientacionais nas membranas (Holt e Killian, 2010; Nguyen, Haney e Vogel, 2011; Ramadurai *et al.*, 2010). Na família de peptídeos helicoidais, PAM com cadeias peptídicas longas tendem a manifestar citotoxicidade contra células de mamíferos. Portanto tal observação coloca a fundação para truncar esses PAM para melhorar a seletividade peptídica (Carneiro *et al.*, 2015).

PAM β -folha, tal como as α e β -defensinas e protegrinas possuem de duas a quatro pontes dissulfeto que lhes atribuem estruturas rígidas e estabilidade em meio aquoso, principalmente quando estão associados a lipídeos. Muitos tipos desse peptídeo são ricos em cisteína. A formação de poros toroidais são a principal forma em que muitos desses peptídeos rompem a membrana bacteriana, sendo inseridos perpendicularmente, apesar de alguns tipos apresentarem mecanismos não líticos (Nguyen, Haney e Vogel, 2011; Seo *et al.*, 2012).

Um representante do grupo dos peptídeos em loop é a tanatina, que é isolado do percevejo, apresentando uma estrutura de 21 resíduos de aminoácidos. Por conter uma ligação dissulfeto interna, forma uma estrutura catiônica secundária importante para sua atividade antimicrobiana (Imamura *et al.*, 2010). Características como pequeno tamanho, estabilidade proteolítica e facilidade de síntese faz com que esses peptídeos discorram de grande interesse em pesquisas (Bala e Kumar, 2014).

Os PAM que se aplicam no grupo de peptídeos estendidos apresentam uma estrutura rica em um ou mais tipos específicos de aminoácidos. Esse grupo inclui peptídeos ricos em prolina, triptofano, arginina e histidina, sem apresentar elementos de estrutura secundária. Apesar de seu mecanismo de ação não ser muito elucidado e muitos desses peptídeos não serem ativos em membranas, tipos de PAM estendidos como a estatina salivar rica em histidina não apresentam ação bacteriostática ou bactericida, no entanto demonstra atividade

fúngica e antiparasitária (Luque-Ortega *et al.*, 2008). Demais peptídeos que se incluem na presente categoria são as catelicidinas; tripsina; a indolicidina, peptídeo rico em triptofano e prolina; bem como Bac5 e Bac7, ricos em resíduos de prolina e arginina (Carneiro *et al.*, 2015; Falla, Karunaratne e Hancock, 1996).

3.8.2 Mecanismos de ação

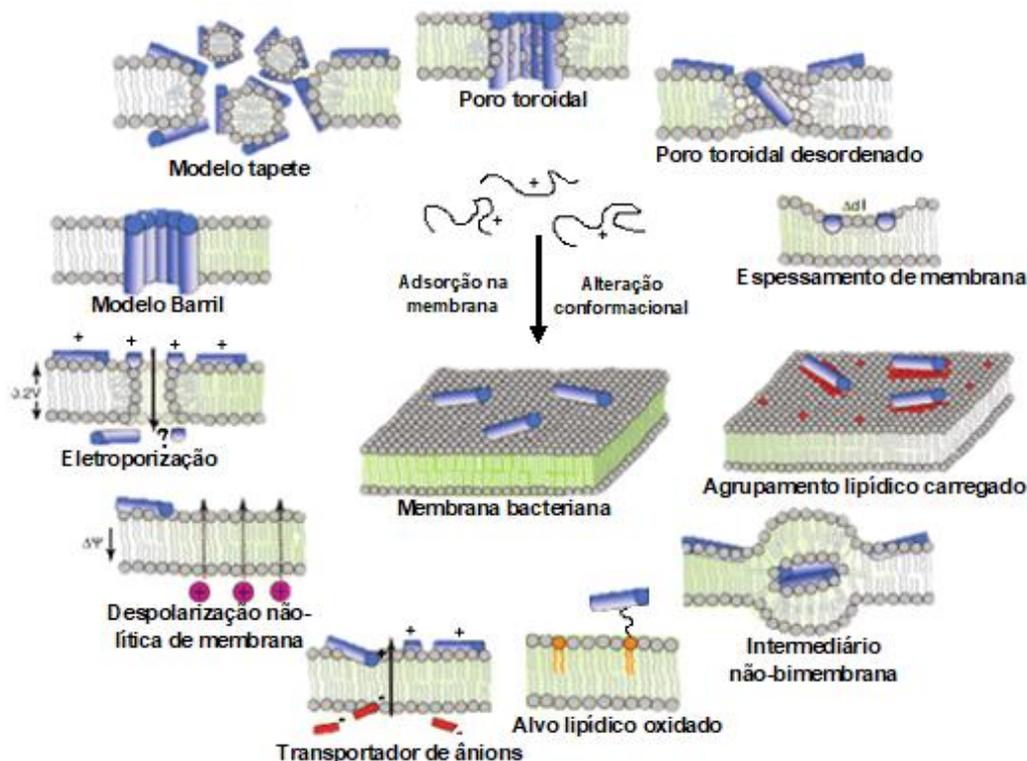
Uma das principais habilidades dispostas por PAM é a sua interação com fosfolipídios, principalmente devido às suas características anfipáticas, permitindo-lhes interagir com estruturas presentes em microrganismos como as membranas celulares. Dessa forma, sua atividade antimicrobiana, bem como a seletiva citotoxicidade, são regidas especialmente por aspectos estruturais moleculares interdependentes, tais como conformação estrutural, carga, hidrofobicidade, anfipaticidade e ângulo polar, o qual a modificação em um desses parâmetros desencadeia uma mudança compensatória nos demais (Ebenhan *et al.*, 2014; Teixeira, Feio e Bastos, 2012; Yeaman e Yount, 2003).

3.8.2.1 Conformação estrutural

Apesar da diferente sequência residual de aminoácidos e estrutura final dos PAM já relatados na literatura, elas tendem a adotar padrões conformacionais semelhantes após interagirem com uma membrana (Figura 16). Os PAM mais comumente encontrados são os α -hélice, o qual alguns desses peptídeos tornam-se helicoidais apenas após interagirem com membranas fosfolipídicas anfipáticas; e β -folha, que apresenta um grupo diverso de moléculas em nível de estrutura primária (Yeaman e Yount, 2003).

Os aminoácidos mais representativos na estrutura dos PAM são a lisina e arginina, que geralmente se concentram em um ligamento da sequência peptídica, respaldando-se assim a natureza catiônica dos PAM e sua consequente interação eletrostática com membranas microbianas carregadas negativamente (Brogden, 2005; Teixeira, Feio e Bastos, 2012).

Figura 16 - Eventos que ocorrem na membrana citoplasmática bacteriana seguida da adsorção do PAM.



Fonte: Adaptado de (Nguyen, Haney e Vogel, 2011).

3.8.2.2 Carga

A maioria dentre os milhares de PAM catiônicos anfipáticos estudados desde então apresentam uma carga positiva que varia entre +2 e +9. Sem dúvida, a cationicidade descreve um papel fundamental na interação eletrotática inicial entre os PAM e as membranas fosfolipídicas de diversos microrganismos tais como bactérias Gram positivas e Gram negativas, e devido a essa mutual eletroafinidade conferida a esses peptídeos, torna-os seletivos a esses patógenos em relação às células do tecido do hospedeiro (Bahar e Ren, 2013; Yeaman e Yount, 2003; Yount *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado com o PAM clavanina A, constatou-se que o efeito reduzido nas hemácias se dá devido à presença de grandes quantidades de esfingolípídeos e colesterol na membrana de células eucarióticas. Tal característica confere à essas células um reforço na membrana plasmática,

deixando-a mais rígida, inibindo assim os efeitos do PAM de permeabilizar e por fim lisar células humanas (Andrade *et al.*, 2015; Kan, E. J. M. Van *et al.*, 2003; Nguyen, Haney e Vogel, 2011).

As bactérias, além de apresentarem uma membrana citoplasmática rica em fosfolipídeos como o fosfatidilglicerol e cardiolipina que já promovem uma carga negativa de superfície, também dispõem de outros componentes de parede que conferem uma ainda maior eletronegatividade, como o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram negativas e o ácido teicóico ou teicurônico nas bactérias Gram positivas (Brown, Santa Maria e Walker, 2013; Putker, Bos e Tommassen, 2015; Teixeira, Feio e Bastos, 2012).

3.8.2.3 Hidrofobicidade

A atividade e seletividade de PAM também é marcada pela influência da hidrofobicidade, que é a percentagem de resíduos hidrofóbicos dentro do peptídeo, em que no caso de PAM, é de aproximadamente 50%. É um parâmetro importante da atividade biológica por determinar a extensão da partição do PAM que entrará no núcleo hidrofóbico da membrana (Tossi, Sandri e Giangaspero, 2000; Yin *et al.*, 2012).

Alguns estudos sugerem que a hidrofobicidade é um fator determinante para a variedade de células-alvo de um PAM, o qual o aumento da hidrofobicidade pode aumentar o número de alvos para determinado peptídeo (Bahar e Ren, 2013; Zelezetsky *et al.*, 2005). Apesar de suas excelentes características, a anfipaticidade é mais importante do que a hidrofobicidade no que diz respeito à ligação de membranas de microrganismos (Fernández-Vidal *et al.*, 2007).

3.8.2.4 Anfipaticidade

A anfipaticidade pode ser definida como a proporção relativa e distribuição de resíduos ou domínios hidrofílicos e hidrofóbicos presentes em um peptídeo.

A forma de medi-la quantitativamente se faz por meio do momento hidrofóbico, calculado como uma soma vetorial da hidrofobicidade de um aminoácido individual que é normalizado em uma hélice ideal. A α -hélice anfipática é a mais comum, apresentando de três a quatro resíduos e uma excelente interação com membranas anfipáticas (Eisenberg, Weiss e Terwilliger, 1984; Yeaman e Yount, 2003).

Dessa forma, a anfipaticidade dos PAM é fundamental para seu mecanismo de ação, uma vez que sua face polar carregada positivamente dirigirá a atração eletrostática inicial aos componentes da membrana carregada negativamente dos microrganismos. Por fim, a face não-polar do peptídeo terá sua inserção na membrana por meio de interações hidrofóbicas e de van der Waals, provocando o aumento da permeabilidade e perda da função barreira (Dathe e Wieprecht, 1999; Hancock e Chapple, 1999; Teixeira, Feio e Bastos, 2012).

3.8.2.5 Ângulo polar

Entende-se como ângulo polar a proporção relativa das facetas polar e não polar do peptídeo em conformação de uma hélice anfipática. Colocando como exemplo um peptídeo helicoidal hipotético em que uma faceta é composta apenas por resíduos hidrofóbicos e a outra unicamente por resíduos carregados, apresenta um ângulo polar de 180°. Dessa forma, para se ter um ângulo polar menor, é necessário uma segregação reduzida entre os domínios ou aumentar a proporção hidrofóbica da hélice (Ebenhan *et al.*, 2014; Yeaman e Yount, 2003). Estudos utilizando peptídeos naturais e sintéticos demonstraram que quanto menor for o ângulo polar e maior for a faceta hidrofóbica, conduz a maior capacidade de permeabilidade de membranas (Uematsu e Matsuzaki, 2000).

Conclui-se então que os parâmetros descritos que conduzem a atividade dos PAM interagem entre si, desempenhando um papel essencial no seu controle de uma forma não independente, uma vez que uma simples mudança em algum dos parâmetros conduzirá a um ajuste compensatório nos demais,

comprovando que estas interrelações são determinantes para se averiguar o mecanismo de ação e atividade biológica de um determinado PAM.

3.8.3 Aplicações

A já estudada e crescente variedade de PAM permite a sua aplicação em diversas áreas, que vão além de sua principal característica, a de ação contra a membrana celular conduzindo à lise de microrganismos, como: bactérias, para o tratamento de biofilmes bacterianos (Stempel, Strehmel e Overhage, 2015); fungos, com a finalidade de uso na agricultura contra a deterioração de grãos (Gupta e Srivastava, 2014); vírus, contra a replicação de arboviroses como a dengue (Carballar-Lejarazú *et al.*, 2008) e contra parasitas, como o protozoário causador da malária *Plasmodium sp.* (D'Alessandro, Tullio e Giribaldi, 2015).

A aplicação contra células tumorais também vem ganhando atenção devido à possibilidade da troca de terapias desgastantes como a quimioterapia, com o uso de PAM que oferecem atividade anticâncer, com excelente seletividade contra essas células (Chu *et al.*, 2015). PAM também oferece uma diversa atividade imunomodulatória com um potencial enorme para aplicações como cicatrização de ferimentos e reguladores do sistema imune inato (Brandenburg *et al.*, 2012).

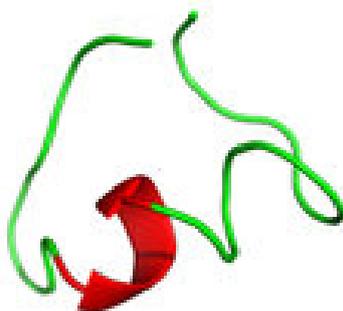
Uma das aplicações que vem crescendo atualmente situa-se no campo de biossensores, o qual os PAM são utilizados como elemento biológico ativo que fará contato e detectará o microrganismo de interesse (Andrade *et al.*, 2015). Nascimento *et al.*, 2014 e Oliveira *et al.*, 2013 destacam o uso de ferramentas eletroquímicas para elucidar o mecanismo de interação de peptídeos com membranas microbiológicas. Utilizando de tais técnicas e da especificidade natural oferecida no reconhecimento biológico através de PAM, há um crescente interesse para seu uso no desenvolvimento de plataformas biossensoras, seja para avaliar a presença de determinado patógeno no ser humano, quanto no monitoramento do controle de águas de rios e oceanos e contaminação de forma geral (Mannoor *et al.*, 2010).

3.8.4 Clavanina A

Tunicados são simples invertebrados marinhos que pertencem ao filo Chordata. São identificadas duas famílias de PAM isolados dos hemócitos do tunicado marinho *Styela clava*: clavaninas e estielinas (Rajanbabu, Chen e Wu, 2015). Enquanto que as estielinas são peptídeos grandes (~3.6 kDa) que contém hidroxilisinas e outros resíduos morificados, as clavaninas são reconhecidas como os menores peptídeos ricos em histidina, apresentando em sua composição estrutural 23 resíduos de aminoácidos (Silva *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 1997).

Clavaninas (Figura 17) constituem uma família de peptídeos anfipáticos e α -hélice aminados que, em semelhança com as magaininas de *Xenopus laevis*, apresentam uma estrutura primária similar de aminoácidos manifestando potente atividade antimicrobiana. Em relação à sua estrutura primária por quantidade de aminoácidos e extremidade C-terminal amidada, as clavaninas dividem-se em 5 classes diferentes, sendo elas A, B, C, D e E (Falanga *et al.*, 2016; Kan, Ellen J. M. Van *et al.*, 2003).

Figura 17 - Estrutura tridimensional da clavanina.



Fonte: Silva *et al.*, 2016

A clavanina A (ClavA) é um PAM que vem ganhando crescente atenção por suas diversas aplicabilidades, principalmente em relação à sua estrutura (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV-NH₂) rica em resíduos de glicina, histidina e fenilalanina, que atuam com um papel importante na atividade antimicrobiana. Ela insere-se de forma eficiente em diferentes camadas fosfolipídicas, agindo de

uma forma pH dependente, devido principalmente a interações hidrofóbicas (Cruz *et al.*, 2014; Kan, Ellen J. M. Van *et al.*, 2003).

O pH do meio age diretamente no modo de ação de ClavA. São descritos dois diferentes mecanismos o qual esse PAM permeabiliza a membrana alvo. Quando presente em pH neutro, ClavA apresenta uma carga levemente positiva, fazendo com que haja desestabilidade na bicamada da membrana desencadeado por meio de interações hidrofóbicas com a falta de especificidade do grupo cabeça lipídica. Entretanto, se ClavA estiver em pH ácido, especificamente em pH 5.5, as histidinas tornam-se protonadas, tornando esse PAM ainda mais potente como agente antimicrobiano, correlacionando-se sua ação no pH neutro (Kan, E. J. M. Van *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

L-cisteína (Cys), Ácido 4-Mercaptobenzoico (AMB), ácido cloroáurico (HAuCl₄), citrato de sódio, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-Hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]), ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]), fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) e fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) foram obtidos da VETEC (Brasil). As bactérias utilizadas no presente estudo foram preparadas em ágar Mueller-Hinton a 37 °C por 24h, e em seguida distribuídas em solução salina em diferentes concentrações (10¹ a 10⁷ UFC.mL⁻¹) de acordo com a escala de McFarland (Andrade *et al.*, 2015). Ademais, todos materiais foram previamente esterilizados. Todos os produtos químicos foram utilizados sem purificação posterior. Em todos os experimentos foi usada água ultrapura obtida pelo sistema de purificação Milli-Q plus (Billerica, USA).

4.2 SÍNTESE E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO PELO ÁCIDO 4-MERCAPTOBENZÓICO

As AuNPs foram sintetizadas pelo método de síntese em fase de solução desenvolvido inicialmente por Turkevich (Turkevich, Cooper e Hillier, 1951) e melhorado por Frens (Frens, 1973), com algumas modificações. Inicialmente, 1 mL de 0,34 M de HAuCl_4 foi adicionado em 99 mL de água ultrapura em um frasco de fundo redondo com dois gargalos. Seguiu-se então com a adição de 4 mL de citrato de sódio a 1%, o qual foi submetida a agitação magnética a 60 °C durante 35 minutos, até que a solução atingisse uma cor púrpura/avermelhada. As AuNPs sintetizadas foram colocadas em temperatura ambiente (25 °C \pm 1 °C). As nanopartículas modificadas com AuNPs-AMB foram obtidas através de um método simples em que as AuNPs são primeiramente diluídas em água ultrapura 1:4 (v/v), seguida pela adição de 0,2 mL de 10^{-3} M de AMB e finalizando por agitação magnética durante 2h (25 °C \pm 1 °C) (Luna *et al.*, 2015). As nanopartículas de AuNPs-AMB são obtidas quando a solução apresenta uma cor azul claro transparente.

4.3 SÍNTESE DE CLAVANINA A

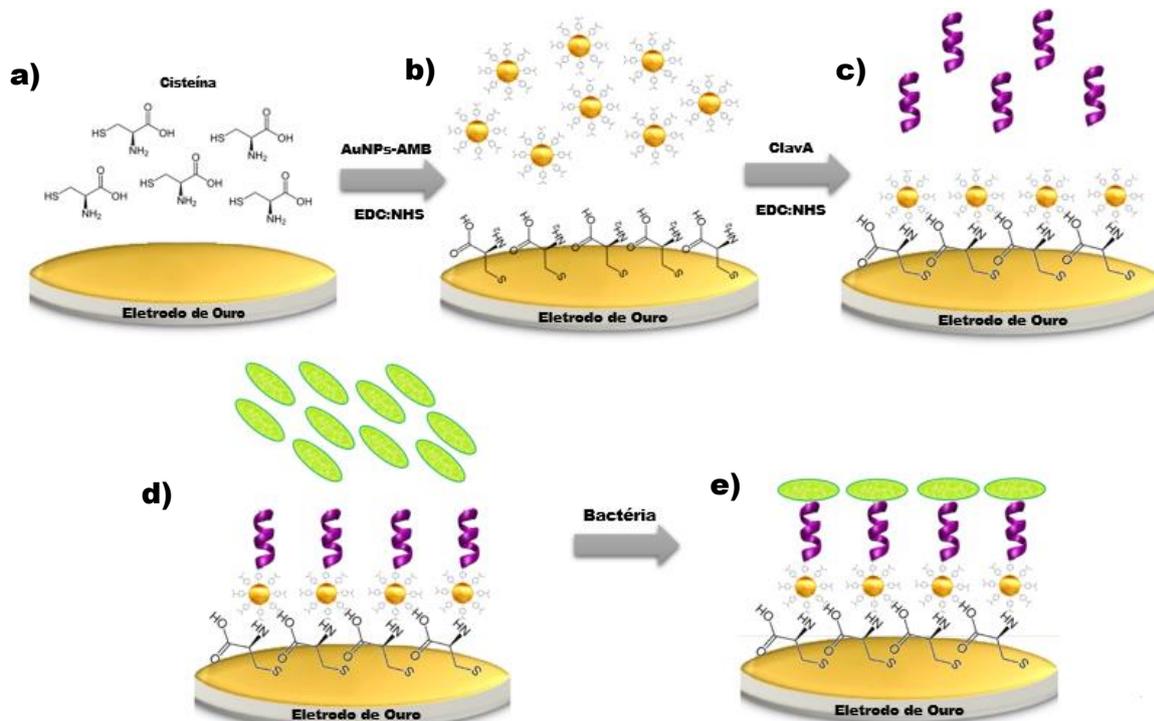
O peptídeo Clavanina A foi sintetizado pela Peptides 2.0 (USA), estratégia de fase sólida com um N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Andrade *et al.*, 2015).

4.4 PREPARO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA

Inicialmente, a superfície do eletrodo de disco de ouro apresentando $\phi = 2$ mm foi polida com pasta de Al_2O_3 , seguida de várias limpezas com água ultrapura e banho de NaClO durante dois minutos. Subsequentemente, 2 μL de uma solução previamente preparada de Cys (30mM) foi gotejada na superfície previamente tratada do eletrodo de ouro por dois minutos (a). Em seguida, objetivando a ativação dos grupamentos amina presentes na Cys, o acoplamento da amina por meio da aplicação do EDC:NHS foi usada (Cannon e

Myszka, 2002), o qual uma solução aquosa de EDC ($0,4 \text{ mM L}^{-1}$) e NHS ($0,1 \text{ mM L}^{-1}$) (1:1 v/v) foi preparada e gotejada no eletrodo de ouro modificado com a MAM de Cys por dois minutos. Em seguida, $2 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de AuNPs-AMB (b) foi gotejada no eletrodo modificado durante o tempo de dois minutos, seguido novamente da adição dos agentes EDC:NHS, visando ativar os grupos carboxílicos livres presentes nas moléculas de AMB. Então, finalizando o sistema sensor, o eletrodo de ouro previamente modificado por Cys_EDC:NHS_AuNPs-AMB_EDC:NHS, foi por fim submetido a $2 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de ClavA ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) (c) durante dois minutos. Assim, $2 \text{ }\mu\text{L}$ de solução ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) (d) contendo diferentes concentrações (10^1 a 10^7 UFC.mL^{-1}) de *Escherichia coli* ATCC 25222, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram incubados na superfície do eletrodo de ouro modificado Cys_AuNPs-AMB_ClavA por dois minutos (e), seguindo então para análises eletroquímicas. Uma representação esquemática do processo de desenvolvimento do biossensor é demonstrado na Figura 18. Todas as medidas foram realizadas em triplicata em $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 18 - Representação esquemática do sistema sensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA.



Fonte: Autor próprio.

4.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Os dados eletroquímicos foram sumariamente obtidos usando um μ Autolab PGSTAT 128N potenciostato/Galvanostato (Ecochemie, Netherlands), interfaciado pelo software NOVA 1.8. Todos os experimentos foram executados usando 20 mL de PBS (pH 7.2) contendo 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1) usado como sonda redox. Medidas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram conduzidas em uma célula convencional composta por três eletrodos: BGE como eletrodo de trabalho, platina como contra-eletrodo e Ag/AgCl (3 M em KCl) como eletrodo de referência.

O espectro de impedância foi realizado na frequência de 100 mHz a 100 kHz, com amplitude e onda senoidal de potencial de 10 mV. Ademais, as medidas de VC foram feitas em potencial -0,2 a 0,7 V com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. Todas as medidas eletroquímicas foram conduzidas em triplicata em 25 °C e dentro de uma gaiola de Faraday.

4.6 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A análise morfológica e estrutural do biossensor foi realizada por um microscópio de força atômica SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japan). Cantilevers com ponta de silicone (Nanoworld, Japan, frequência ressonante = 300 kHz, força constante = 42 N.m⁻¹) foram usados no modo não contato, em 25 °C \pm 1 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A SIMPLE NANOSTRUCTURED IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED ON CLAVANIN A PEPTIDE FOR BACTERIAL DETECTION

5.1.1 Medidas UV-VIS

O espectro UV-Vis das AuNPs e AuNPs-AMB apresentaram um forte pico de absorção em 525 nm. Outros estudos descrevem esse espectro sendo uma das principais características da ressonância plasmônica do ouro coloidal (Murphy *et al.*, 2008).

Depois da modificação química com o AMB, a solução de AuNPs demonstra uma diminuição da intensidade da banda de absorção UV-Vis. Este resultado indica a agregação das moléculas de AMB na superfície do AuNPs, característica essa que foi confirmada também pela mudança da cor original das AuNPs, o qual apresenta uma cor avermelhada/roxa, e após a modificação com AMB, a solução adquire cor azul.

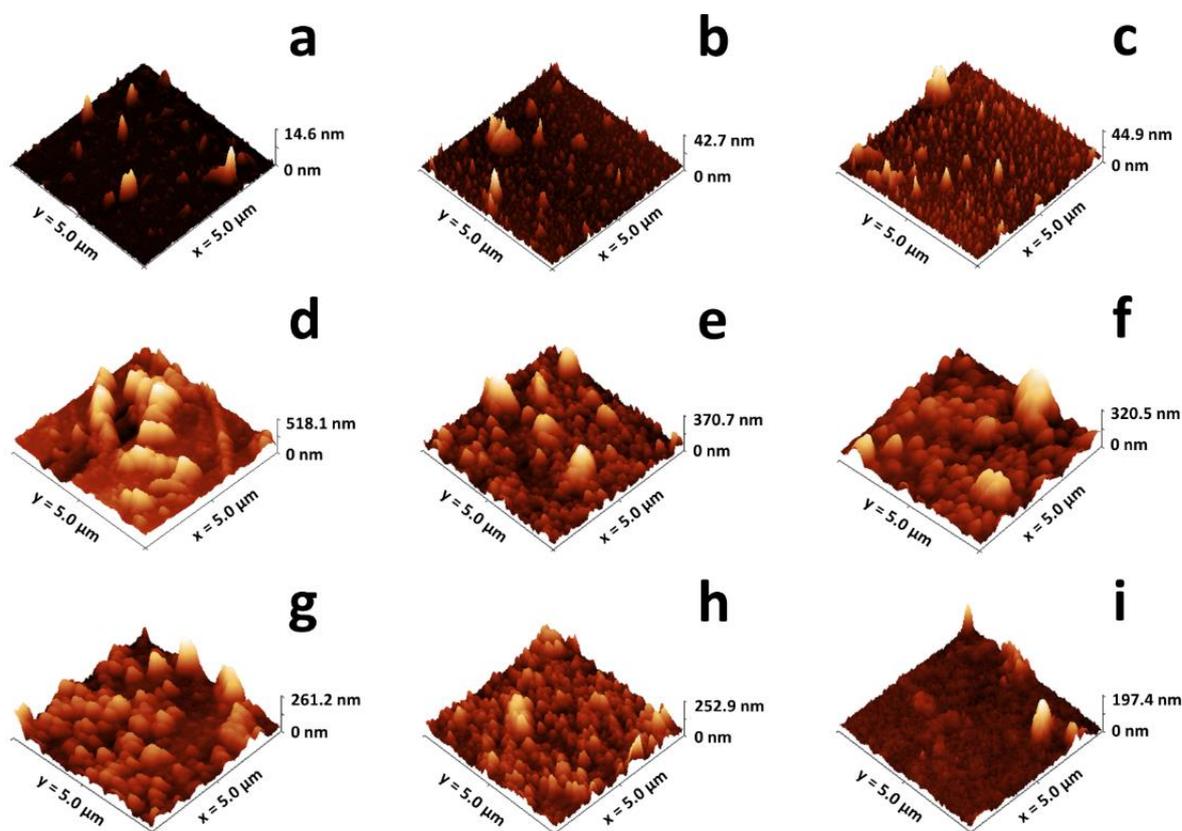
5.1.2 Caracterização morfológica

A análise morfológica e topográfica da construção do biossensor nanoestruturado e as mudanças de superfície após interações com as cepas bacterianas foram avaliadas por microscopia de força atômica (Figura 19). Foi observada uma monocamada automontada de Cys bem distribuída na superfície do eletrodo de ouro (Figura 19a). A altura obtida de 14,6 nm confirmaram a formação de uma MAM. Um resultado similar foi reportado por Huayhuas-Chipana, Gomero e Sotomayor, 2014. A adsorção das AuNPs-AMB resultou no aumento da rugosidade do sistema, com um tamanho de 42,7 nm (Figura 19b). Um aumento no tamanho (44,9 nm) ocorreu após a imobilização da ClavA (Figura 19c). Tais resultados apresentam similaridades com outros estudos, de acordo com a literatura (Knecht e Walsh, 2014).

Observou-se um aumento notável no tamanho e rugosidade para todas as bactérias do estudo (Figura 19 d-i). A topografia da superfície do eletrodo mudou após a interação com as bactérias, sugerindo o reconhecimento seletivo proposto pela ClavA (Andrade *et al.*, 2015). O resultado do reconhecimento da *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. typhimurium* foram 518,1 nm, 370,5 nm e 320,5 nm, respectivamente (Figura 19d-f). Por outro lado, as bactérias Gram-positivas

apresentaram como resultado alturas inferiores (Figura 19g-i) em relação às Gram-negativas.

Figura 19 - Imagens topográficas obtidas do eletrodo de ouro modificado por Cys (a), Cys_AuNPs-AMB (b), Cys_AuNPs-AMB_ClavA (c), Cys_AuNPs-AMB_ClavA-*E. coli* (d), Cys_AuNPs-AMB_ClavA-*K. pneumoniae* (e), Cys_AuNPs-AMB_ClavA-*S. typhimurium* (f), Cys_AuNPs-AMB_ClavA-*E. faecalis* (g), Cys_AuNPs-AMB_ClavA-*B. subtilis* (h) e Cys_AuNPs-AMB_ClavA-*S. aureus* (i).



Fonte: Autor próprio.

5.1.3 Caracterização eletroquímica da plataforma Cys_AuNPs-AMB_ClavA

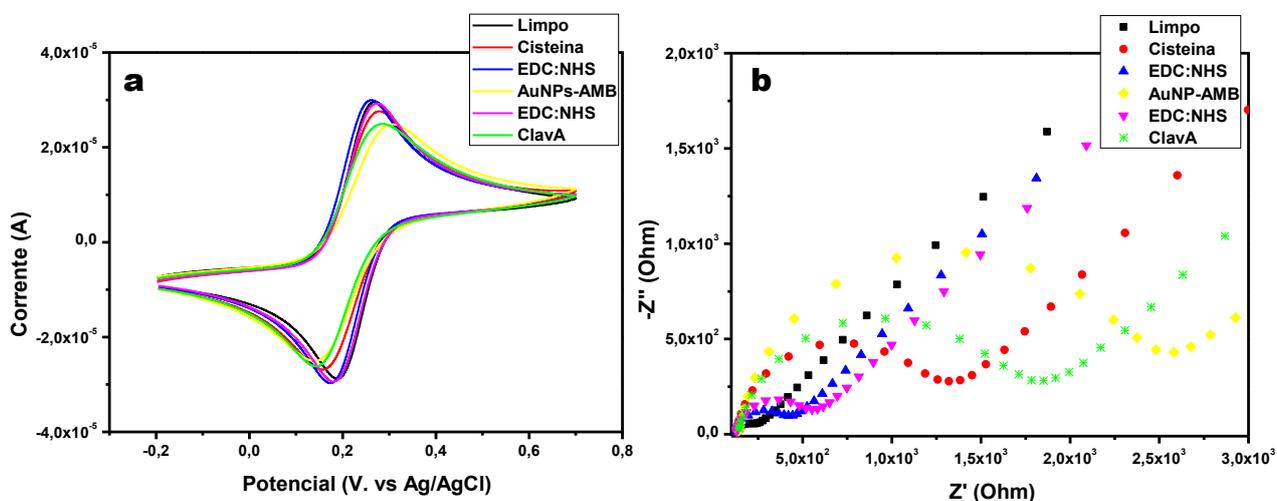
A Figura 20 mostra o voltamograma cíclico e o espectro de impedância da modificação de superfície do eletrodo de ouro. A sonda redox fornece um voltamograma cíclico reversível com picos anódicos e catódicos bem definidos, como se mostra na Figura 20 a. Obteve-se uma diminuição na resposta da

corrente de pico depois da modificação por Cys, certificando a formação da MAM.

Por adsorção espontânea, Cys é capaz de formar MAM em superfícies metálicas como ouro, prata, cobre, platina, etc. de forma simples e rápida devido ao grupo tiol (-SH) presente em sua estrutura, o qual a adsorção em superfícies de ouro é considerada a melhor (Galal, Atta e El-Ads, 2012; Mocanu *et al.*, 2009). Embora seu grupo tiol se ligue fortemente ao ouro através da desprotonação para obter uma monocamada, o grupo carboxílico e amina presente na estrutura de Cys também permite a interação com o ouro por meio de uma interação não-covalente e não-equivalente (Häkkinen, 2012). Quando comparado com outros compostos tiolados, Cys se qualifica devido a seu baixo custo, além de se mostrar como melhor agente formador de MAM (Patil *et al.*, 2014; Qingwen *et al.*, 2001).

A resistência a transferência de elétrons observada para variação do tamanho dos picos é atribuída a diferenças entre as correntes de pico, bem como seu potencial de pico como se mostra no processo de formação da plataforma biossensora (Kreysa, Ota e Savinell, 2014).

Figura 20 - Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do processo de modificação de eletrodo pelo sistema Cys_AuNPs-AMB_ClavA: Limpo (■), Cisteína (●), Cys_EDC:NHS (▲), Cys_EDC:NHS_AuNPs-MBA (◆), Cys_EDC:NHS_AuNPs-MBA_EDC:NHS (▼), Cys_EDC:NHS_AuNPs-MBA_EDC:NHS_ClavA (*).



Fonte: Autor próprio.

Em adição, a amina terminal (-NH₂) exposta após a formação da MAM pode ser usada para a ligação de biomoléculas e nanopartículas funcionalizadas. Nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido 4-mercaptobenzóico foram utilizadas, o qual antes de sua aplicação, foram utilizados os agentes EDC:NHS. O grupamento amina presente no eixo terminal da estrutura de Cys reage com o éster NHS, resultando em uma ligação amida estável (Samanta e Sarkar, 2011). O voltamograma cíclico revela um aumento na resposta das correntes de pico devido as cargas positivas/neutras presentes no éster NHS, levando então a transferência do par redox negativo à superfície do eletrodo (Geng *et al.*, 2008).

A próxima etapa compreende o acoplamento das AuNPs-AMB á monocamada de Cys. A ativação dos grupos amina por meio do EDC:NHS permitiu uma ligação covalente com o grupo carboxílico livre da estrutura do AMB, diminuindo a corrente de pico do voltamograma cíclico. O anel aromático no AMB também melhorou a transferência de elétrons na interface eletrodo-solução, diminuindo ainda mais a corrente de pico no voltamograma (Wang *et al.*, 2011).

Embora haja a possibilidade de detecção elétrica direta de analitos, o uso combinado de AuNPs com biossensores eletroquímicos fornece diversos benefícios devido à propriedades eletroativas e catalíticas, aumentando assim a sensibilidade do biossensor (Li, Schluesener e Xu, 2010; Wittenberg e Haynes, 2009).

A abordagem elétrica e eletroquímica proposta pelas AuNPs geralmente repousa nas mudanças das respostas ôhmicas de um circuito elétrico ou no fluxo de elétrons criado em um processo faradaico, tal como oxidação e redução próximo a superfície de um eletrodo para melhorar a biossensibilidade (Doria *et al.*, 2012).

Subsequentemente, o EDC:NHS foi reaplicado objetivando obter o éster NHS pela troca do grupo carboxílico do AMB, cujo voltamograma mostrou novamente um aumento na resposta da corrente de pico. Em seguida, finalizando a construção da plataforma biossensora, ClavA foi conjugada ao eletrodo modificado por Cys e AuNPs-AMB, cujo voltamograma demonstrou um

comportamento quase-reversível com um aumento no sinal das correntes de pico catódicas e anódicas, com uma resposta maior que os passos anteriores de formação da plataforma.

A ligação da ClavA ao complexo AuNPs-AMB ocorreu devido ao uso prévio do EDC:NHS, por meio da geração de um éster intermediário ativo, desenvolvendo uma ligação amida e a imobilização do peptídeo no eletrodo de ouro previamente modificado (Carrascosa *et al.*, 2006).

As medidas de EIE fornecem informação adicional sobre o processo de modificação de superfície do eletrodo, bem como da sua ação biossensora, baseado na medida da resistência à transferência de carga (R_{ct}) que ocorre na interface do eletrodo com o par redox. Portanto, a deposição de qualquer camada bloqueadora na superfície de um eletrodo, bem como qualquer simples evento de ligação pode ser facilmente detectado e avaliado pelas mudanças no R_{ct} e capacitância (Lisdar e Schäfer, 2008).

Assim, o R_{ct} fornece os dados do diâmetro do semicírculo presente no diagrama de Nyquist. Em adição, tal resistência define a cinética de transferência de elétrons da sonda redox ocorrendo na interface do eletrodo, tornando-a essencial no estudo e monitoramento de processos interfaciais (Razmi e Mohammad-Rezaei, 2013).

Como descrito na Figura 20b, o diagrama de Nyquist demonstra um espectro de impedância gradual que se refere ao processo de modificação de superfície do eletrodo, ocorrendo em uma frequência entre 100 mHz e 100 kHz. Foram obtidas variações na impedância, e anteriormente ao processo de formação da MAM de Cys, há um pequeno aumento na R_{ct} do eletrodo de ouro limpo ($R_{ct} = 252 \Omega$). Então, após a adição de Cys no eletrodo, obteve-se uma maior resistência interfacial à transferência de elétrons ($R_{ct} = 1,11 K\Omega$), indicando a adequada formação da monocamada adsorvida na superfície do eletrodo, obstruindo a transferência de elétrons na interface com a sonda redox.

Após a primeira modificação do eletrodo com a MAM de Cys, houve a aplicação das AuNPs-AMB, e como esperado, o R_{ct} aumentou consideravelmente ($R_{ct} = 2,26 K\Omega$), reforçando a eficiência e as propriedades

que as AuNPs podem desenvolver na transferência de elétrons em superfícies de eletrodos, promovendo então o aprimoramento da sensibilidade do analito no processo de detecção (Chen, Mwakwari e Oyelere, 2008; Tiwari *et al.*, 2011).

Em adição, tais dados confirmam a ligação de AuNPs-AMB sobre a monocamada de Cys, formando um caminho adequado para a transferência de elétrons entre a MAM de Cys e o peptídeo ClavA na detecção de bactérias. Subsequentemente, antes e após a adição das AuNPs-AMB, houve a adição dos agentes acopladores EDC:NHS, cuja resposta em ambas aplicações culminaram na diminuição do R_{ct} ($R_{ct} = 295 \Omega$) e ($R_{ct} = 354 \Omega$), respectivamente.

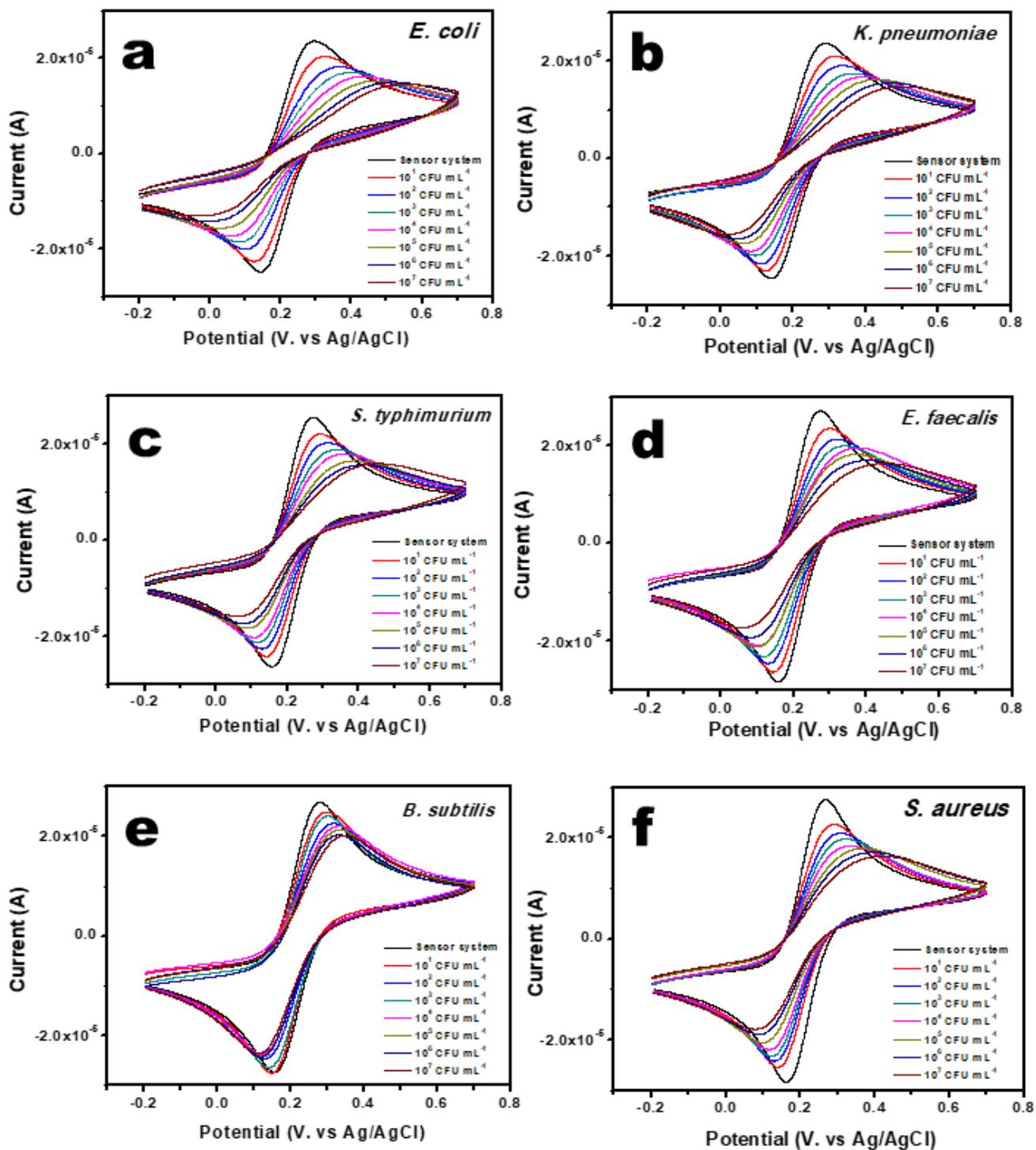
Por fim, a última camada a ser adicionada que compreende a ClavA, resultou no aumento da resistência interfacial ($R_{ct} = 1,62 K\Omega$), certificando seu acoplamento na superfície do eletrodo, finalizando então a plataforma biossensora Cys_AuNPs-AMB_ClavA.

Características como estabilidade e habilidade de se ligar com múltiplas espécies de microrganismos (Andrade *et al.*, 2015; Kulagina *et al.*, 2005) tornou a ClavA uma excelente alternativa de molécula de biorreconhecimento contra diversas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas neste estudo.

5.1.4 Caracterização eletroquímica da detecção de bactérias pelo biossensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA

Os voltamogramas cíclicos e diagramas de Nyquist do biossensor exposto a diferentes concentrações de bactérias é mostrado na Figura 21 e Figura 22, respectivamente. A Figura 21 a-f representa o VC do biossensor para diferentes concentrações de bactérias em solução, com sua respectiva resposta impedimétrica, realizado entre as concentrações 10^1 - 10^7 UFC mL⁻¹. Seguido a modificação do eletrodo por ClavA, os picos do voltamograma descreveram uma diminuição sequencial realizada entre o limite de detecção mínimo (10^1 UFC mL⁻¹) ao máximo (10^7 UFC mL⁻¹) alcançado pela plataforma

Figura 21 - Voltamograma cíclico do sistema sensor seguido pela resposta eletroquímica após contato com as bactérias em diferentes concentrações: *E. coli* (a), *K. pneumoniae* (b), *S. typhimurium* (c), *E. faecalis* (d), *B. subtilis* (e) and *S. aureus* (f). Sonda redox: 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) em solução PBS (pH 7,2); taxa de varredura: 50 mV s^{-1} .



Fonte: Autor próprio.

Dentre as Gram-negativas, a *S. typhimurium* (Figura 21 c) apresentou menor resposta voltamétrica/impedimétrica em detrimento das demais, devido a reduzida carga negativa relativa de superfície, atribuindo-lhe uma menor resistência a transferência de carga (Dickson, Koohmaraie e Hruska, 1989). A percentagem de desvio relativo (PDR) explica a extensão da biodeteção apresentada pelo eletrodo (Costa *et al.*, 2014), sendo expressa como:

$$\Delta I (\%) = \frac{\left(\frac{1}{I_b}\right) - \left(\frac{1}{I_a}\right)}{\left(\frac{1}{I_b}\right)} \times 100 \quad \text{Eq. 11}$$

Onde I_b e I_a correspondem a corrente de pico anódica antes e depois da plataforma ser finalizada pela ClavA, respectivamente. Dessa forma, a Tabela 2 mostra o PDR do eletrodo modificado Cys_AuNPs-AMB_ClavA antes e após o contato com diferentes concentrações de múltiplas espécies de bactérias. Os resultados demonstraram o aumento gradual dos valores de ΔI , em função do aumento da concentração de bactéria. O processo de biorreconhecimento repousa na variação da corrente de pico devido ao bloqueio do processo redox na interface eletrodo-solução gerada pela interação ClavA \rightarrow bactéria. Além disso, ambos picos catódicos e anódicos diminuem de acordo com o aumento nos valores de ΔI .

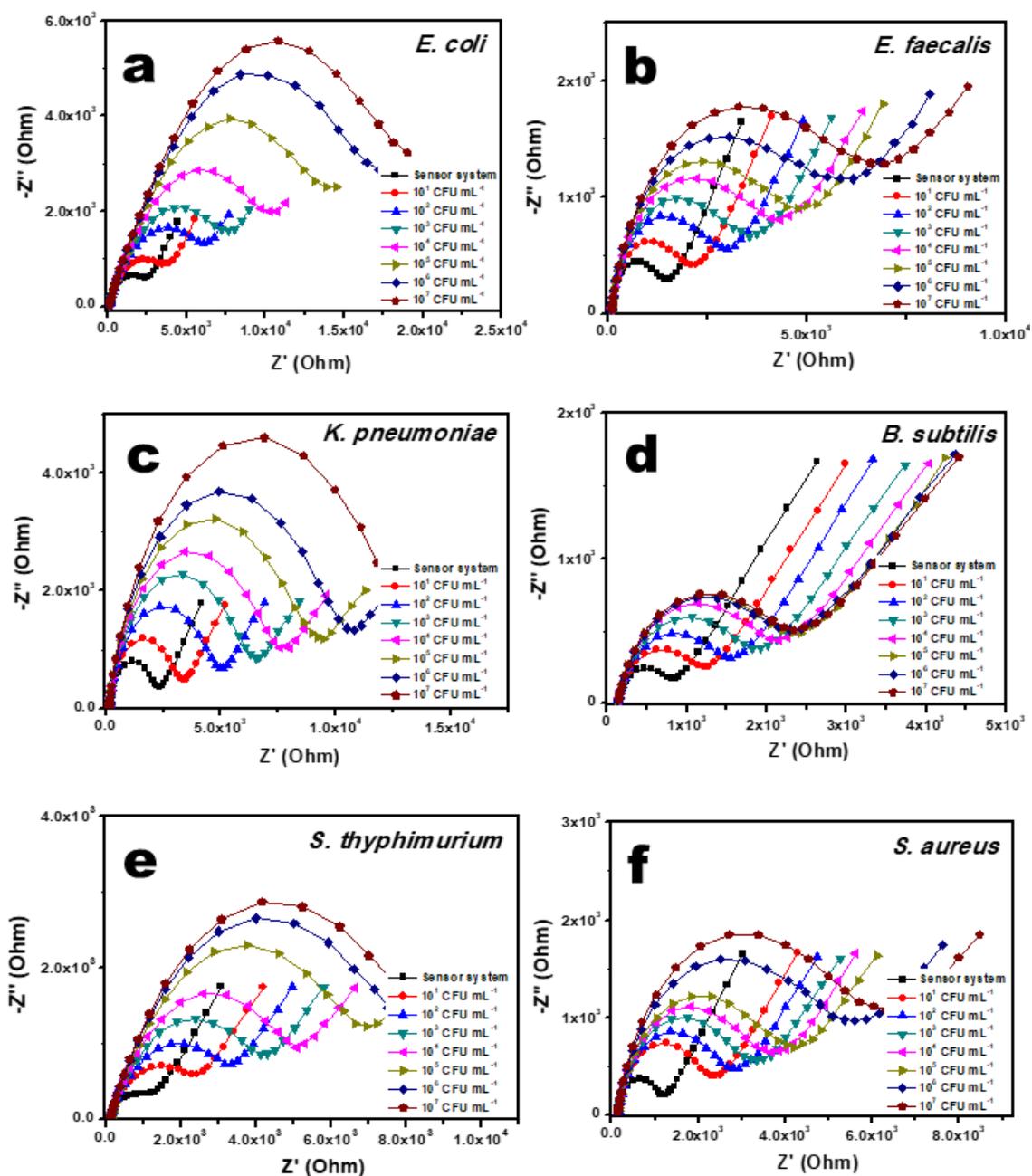
Tabela 2 - Percentagem de desvio relativo do biossensor antes e depois da interação com a bactéria em diferentes concentrações. ^a Sistema sensor= Cys_AuNPs-AMB_ClavA antes do contato com as bactérias (10^1 - 10^7 CFU mL⁻¹); ^b Após contato com *E. coli*; ^c Após contato com *K. pneumoniae*; ^d Após contato com *S. typhimurium*; ^e Após contato com *B. subtilis*; ^f Após contato com *E. faecalis*; ^g Após contato com *S. aureus*.

AMOSTRA	Antes a ($1/I_b$, μA^{-1})	ΔI (%) - 10^1	ΔI (%) - 10^2	ΔI (%) - 10^3	ΔI (%) - 10^4	ΔI (%) - 10^5	ΔI (%) - 10^6	ΔI (%) - 10^7
Após b ($1/I_a$, μA^{-1})	0,276	10,09%	18,10%	23,11%	21,14%	33,49%	38,11%	41,40%
Após c ($1/I_a$, μA^{-1})	0,276	8%	12,38%	18,10%	22,47%	28,31%	32,18%	36,40%
Após d ($1/I_a$, μA^{-1})	0,276	2,47%	7,38%	12,93%	20,91%	22,03%	23,96%	25,40%
Após f ($1/I_a$, μA^{-1})	0,276	5,80%	10,09%	13,47%	13,47%	13,47%	15,59%	17,36%
Após g ($1/I_a$, μA^{-1})	0,276	4,82%	10,09%	13,47%	19,76%	18,58%	22,03%	28,86%
Após h ($1/I_a$, μA^{-1})	0,276	1,42%	6,44%	9,50%	12,38%	18,58%	21,36%	23,75%

Fonte: Autor próprio.

Ao lado das medidas de VC, a EIE também foi usada para avaliar o processo de interação ocorrendo entre a plataforma sensora Cys_AuNPs-AMB_ClavA e as bactérias, sendo representada na Figura 22. A caracterização impedimétrica revela que os espectros de impedância se relacionam com os resultados de VC.

Figura 22 - Diagramas de Nyquist do sistema sensor após contato com as bactérias em diferentes concentrações: *E. coli* (a), *E. faecalis* (b), *K. pneumoniae* (c), *B. subtilis* (d), *S. typhimurium* (e) e *S. aureus* (f).

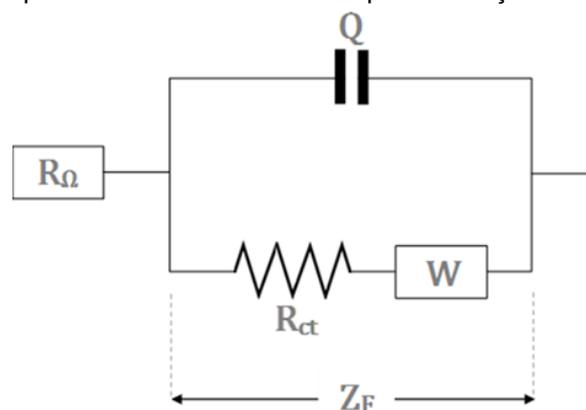


Fonte: Autor próprio.

Após a deposição da bactéria, os diagramas de Nyquist apresentam um aumento sequencial no diâmetro do semicírculo de acordo com o aumento da concentração da bactéria, cujo R_{ct} dos resultados obtidos demonstrados na Tabela 3 também apresentam uma razão proporcional entre a concentração da bactéria e os valores obtidos de R_{ct} . Tais dados corroboram e testificam a habilidade do biossensor proposto pelo estudo de analisar quantitativamente as bactérias.

Com a finalidade de facilitar a interpretação dos dados experimentais de impedância, frequentemente faz-se uso de modelos de circuito equivalentes (Lisdar e Schäfer, 2008). O presente trabalho fez uso do circuito de Randles, como visto na Figura 23, sendo aplicado para determinar os parâmetros elétricos para determinada concentração de analitos (Faridbod, Norouzi e Ganjali, 2015; Kreysa, Ota e Savinell, 2014). Sua estrutura compreende a resistência da solução eletrolítica (R_{Ω}) e uma combinação paralela da capacitância de dupla camada elétrica (C_{dl}), resistência a transferência de carga (R_{ct}) e o elemento de Warburg (W) (Chang e Park, 2010; Scholz, 2010b).

Figura 23 - Circuito equivalente de Randles usado para obtenção dos valores de impedância.



Fonte: autor próprio.

Quando há a aplicação de analitos eletricamente carregados tais como bactérias e peptídeos na superfície de um eletrodo, as mudanças e diferenças de carga na superfície do eletrodo desenvolverá uma força repulsiva ou atrativa, interrompendo a migração do fluxo de elétrons, levando à variação impedimétrica do sistema (Ahmed *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2015; Kogikoski *et al.*, 2016).

Tabela 3 - Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância

Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R _{ct} (kΩ)	Q (μF)	n	θ
<i>E. coli</i>				
10 ¹	3.6	9.92	0.62	0.34
10 ²	6.03	10.8	0.604	0.6
10 ³	7.64	11.2	0.601	0.68
10 ⁴	10.6	11.6	0.592	0.77
10 ⁵	14.8	11.7	0.59	0.83
10 ⁶	18.8	11.8	0.586	0.87
10 ⁷	21.3	11.6	0.586	0.89
<i>K. pneumoniae</i>				
10 ¹	3.05	1.24	0.843	0.22
10 ²	4.59	1.36	0.83	0.48
10 ³	6.05	1.33	0.828	0.6
10 ⁴	7.12	1.32	0.829	0.66
10 ⁵	8.58	1.32	0.83	0.72
10 ⁶	9.86	1.33	0.829	0.75
10 ⁷	12.3	1.34	0.828	0.8
<i>S. typhimurium</i>				
10 ¹	2.4	9.5	0.667	0.01
10 ²	3.21	8.77	0.675	0.26
10 ³	4.16	8.11	0.685	0.43
10 ⁴	5.11	7.49	0.693	0.53
10 ⁵	7.01	6.91	0.697	0.66
10 ⁶	8.14	6.56	0.7	0.7
10 ⁷	8.69	6.24	0.706	0.72
<i>B. subtilis</i>				
10 ¹	2.35	1.4	0.872	0.001
10 ²	2.91	1.42	0.872	0.13
10 ³	3.27	1.41	0.872	0.28
10 ⁴	3.66	1.41	0.872	0.39
10 ⁵	3.94	1.24	0.882	0.45
10 ⁶	4.28	1.17	0.883	0.54
10 ⁷	4.52	1.13	0.877	0.6
<i>E. faecalis</i>				
10 ¹	2	2.05	0.749	0.008
10 ²	2.73	2.03	0.745	0.18
10 ³	3.3	2.17	0.737	0.27
10 ⁴	3.92	2.18	0.734	0.35
10 ⁵	4.35	2.2	0.74	0.39
10 ⁶	5.2	2.25	0.723	0.44
10 ⁷	6.02	2.22	0.723	0.47
<i>S. aureus</i>				
10 ¹	2.15	1.59	0.785	0.01
10 ²	2.57	1.68	0.777	0.07
10 ³	3.03	1.68	0.776	0.21
10 ⁴	3.38	1.68	0.774	0.29
10 ⁵	3.78	1.76	0.77	0.37
10 ⁶	5.01	1.82	0.776	0.52
10 ⁷	5.67	1.58	0.777	0.58

Seguido os resultados já descritos, foi observado que a plataforma biossensora formada por ClavA retém a habilidade de reconhecer diferentes espécies de bactéria em diferentes concentrações. Portanto, usando a variação relativa do R_{ct} (ΔR_{ct}), é possível avaliar a performance do biossensor para a detecção das bactérias, de acordo com a equação abaixo (Simão *et al.*, 2016):

$$\Delta R_{ct}(\%) = \frac{R_{ct(bac)} - R_{ct(sensor)}}{R_{ct(sensor)}} \times 100 \quad \text{Eq. 12}$$

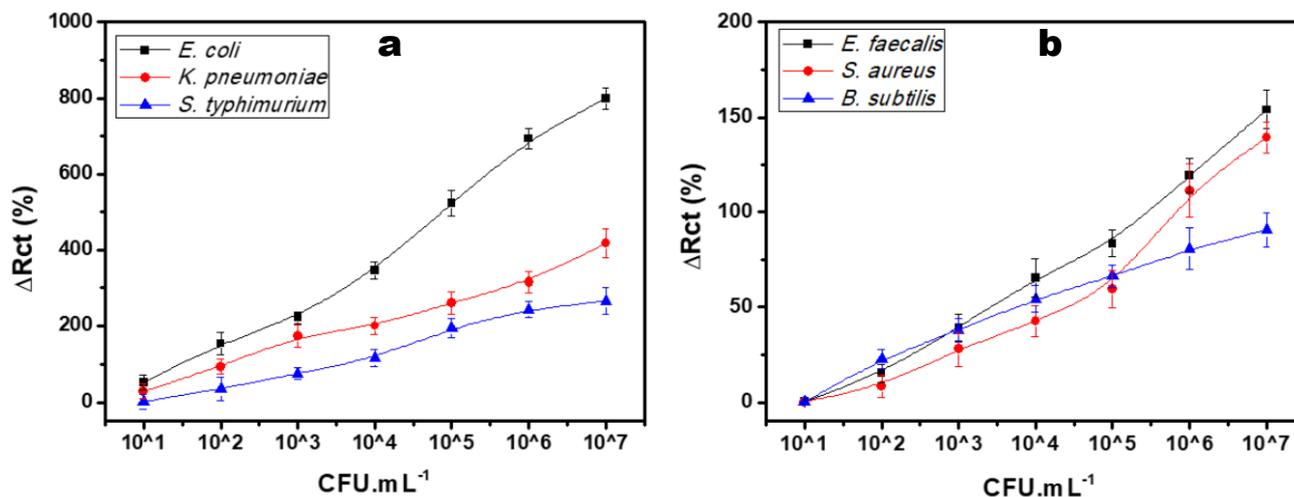
Onde $R_{ct(sensor)}$ corresponde ao valor da resistência a transferência de carga do biossensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA antes do contato com as diferentes concentrações das bactérias. $R_{ct(bac)}$ é o valor do R_{ct} obtido após as bactérias *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *E. faecalis*, *B. subtilis* e *S. aureus* serem expostas ao biossensor.

A Figura 24 apresenta o efeito das diferentes concentrações (10^1 - 10^7 UFC mL^{-1}) das bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. typhimurium*) e Gram-positivas (*E. faecalis*, *B. subtilis* e *S. aureus*) no ΔR_{ct} durante a interação com o biossensor.

Foram obtidos valores baixos de ΔR_{ct} para todas as bactérias Gram-positivas avaliadas no estudo, seguida por valores maiores de ΔR_{ct} para todas as Gram-negativas, refletindo então a habilidade da ClavA em distinguir diferentes estruturas na superfície de bactérias (Andrade *et al.*, 2015).

As bactérias apresentaram um ΔR_{ct} crescente como se segue: *B. subtilis* < *S. aureus* < *E. faecalis* < *S. typhimurium* < *K. pneumoniae* < *E. coli*.

Figura 24 - ΔR_{ct} para o sistema sensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA após exposição com as diferentes concentrações de bactéria. O R_{ct} das bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b) usados para obtenção dos dados ΔR_{ct} abaixo estão descritos na Tabela 2.



Fonte: autor próprio.

A superfície carregada positivamente da ClavA interage de forma eficiente com diferentes camadas fosfolipídicas presentes na superfície de bactérias. Ademais, bactérias Gram-positivas também apresentam uma camada espessa de peptidoglicano, resultando em uma camada superficial mais positiva em relação às Gram-negativas, que dispõe de uma camada mais fina e interna de peptidoglicano, originando uma superfície eletronegativamente carregada (Kan, Ellen J. M. Van *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2016).

PAMs apresentam a habilidade de interação com fosfolipídios devido a suas características anfipáticas, permitindo uma forte interação com membranas celulares. Dessa forma, esses e outros aspectos moleculares estruturais que são interdependentes tornam PAMs como a ClavA um instrumento para a detecção segura e seletiva de microrganismos mesmo na presença de células sanguíneas como as hemácias (Ebenhan *et al.*, 2014; Teixeira, Feio e Bastos, 2012; Yeaman e Yount, 2003; Yount e Yeaman, 2013).

Objetivando comprovar a detecção biológica, o grau de revestimento superficial ocasionado pelas bactérias (θ) foi usado como parâmetro adicional para avaliar o preenchimento dos sítios de reconhecimento pelas bactérias sobre

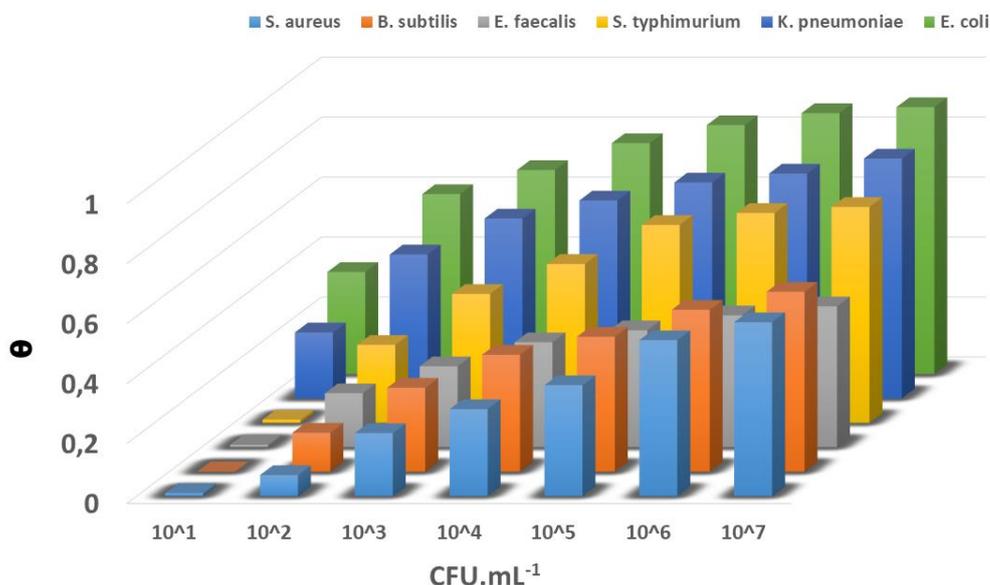
a superfície do sistema Cys_AuNPs-AMB_ClavA, como descrito abaixo (Andrade *et al.*, 2015):

$$\theta = \frac{1-R_{biosensor}}{R_{bacteria}} \quad \text{Eq. 13}$$

Onde $R_{biosensor}$ corresponde à resistência a transferência de carga do eletrodo modificado e $R_{bacteria}$ representa o R_{ct} obtido pelas diferentes concentrações de bactérias na superfície do eletrodo modificado.

Figura 25 mostra um gráfico de θ em função de cada concentração predeterminada de bactéria (10^1 - 10^7 UFC mL⁻¹). Os resultados revelaram que os valores de θ diminuem com o aumento da concentração das bactérias, e em 10^7 UFC mL⁻¹ foram obtidos os seguintes valores ~0,89 (89%), ~0,80 (80%), ~0,72 (72%), ~0,60 (60%), ~0,58 (58%) e ~0,47 (47%) para *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. faecalis*, respectivamente.

Figura 25. Valores do grau de revestimento superficial (θ) em função da concentração das bactérias (10^1 - 10^7 UFC mL⁻¹). Todos dados usados para calcular o θ estão demonstrados na tabela 2.



Fonte: Autor próprio.

Quando comparada com outras plataformas biossensoras que possuem diferentes tipos de PAM como elemento de detecção biológico ativo, descrito na Tabela 4, o biossensor composto por Cys_AuNPs-AMB_ClavA demonstra maior sensibilidade e ampla detecção contra diferentes microrganismos quando

relacionado a outras plataformas, cuja detecção limita-se a uma ou duas bactérias em sua maioria.

Tabela 4. Plataformas biossensoras formadas por peptídeos antimicrobianos seguida de seus microrganismos alvo e limites de detecção.

PAMs	Bactéria Alvo	Limite de Detecção (UFC.mL ⁻¹)	Técnica	Referência
Clavanina A	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	10 ¹	Impedância eletroquímica	Este trabalho.
Magainina I	<i>Listeria sp.</i> <i>Escherichia coli</i>	10 ⁴	Transistor de efeito de campo	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
Magainina I	<i>Escherichia coli</i>	10 ³	Fluorescência	(Chang <i>et al.</i> , 2015)
Magainina I	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i>	10 ⁷	Fluorescência	(Kulagina <i>et al.</i> , 2005)
Clavanina A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	10 ²	Impedância eletroquímica	(Andrade <i>et al.</i> , 2015)
C16G2cys	<i>Streptococcus mutans</i>	10 ⁴	Impedância eletroquímica	(Lillehoj <i>et al.</i> , 2013)
G10KHc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ⁴	Impedância eletroquímica	(Lillehoj <i>et al.</i> , 2013)
Leucocina A	<i>Listeria monocitogenes</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	10 ³	Impedância eletroquímica	(Etayash <i>et al.</i> , 2014)
Indolicidina	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁸	Fluorescência	(Schwartz e Bercovici, 2014)
Colicina V	<i>Escherichia coli</i>	10 ²	Impedância eletroquímica	(Jiang <i>et al.</i> , 2015)
K-7α12	<i>Listeria innocua</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Escherichia coli</i>	10 ³	Espectrometria	(Tenenbaum e Segal, 2015)

Fonte: autor próprio.

O limite de detecção alcançado pelo biossensor proposto foi de 10^1 UFC/mL⁻¹ para todas as seis bactérias do estudo, cuja concentração compreende 0.01 bactérias μ L⁻¹.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- Um biossensor eletroquímico baseado em monocamadas automontadas de Cys, nanopartículas de ouro modificadas e ClavA foi desenvolvido.
- As análises microscópicas realizadas por AFM e eletroquímicas por medidas voltamétricas e impedimétricas revelaram a correta imobilização das camadas que compõem a plataforma nanoestruturada, formando o biossensor Cys_AuNPs-AMB_ClavA na superfície do eletrodo de ouro.
- Em adição, as técnicas de VC e EIE também indicaram uma excelente detecção das bactérias Gram positivas e Gram negativas do estudo, cujo limite de detecção alcançado foi de 10^1 UFC mL⁻¹.
- O biossensor apresentou maior sensibilidade para bactérias Gram negativas devido a sua maior carga negativa de superfície.
- A plataforma biossensora nanoestruturada também foi capaz de diferenciar as diferentes espécies de bactéria, devido às características estruturais e físico-químicas apresentadas pela ClavA.
- A construção do biossensor de forma simples e rápida tem como perspectiva principal a realização de ensaios utilizando amostras clínicas como sangue, suor, saliva e LCR, objetivando obter maior validação analítica.
- O biossensor desenvolvido mostrou reconhecimento específico para seis diferentes bactérias e em um mínimo limite de detecção, um dos menores apresentados na literatura. Portanto, espera-se o desenvolvimento futuro de novos protocolos experimentais.
- Biossensores eletroquímicos são excelentes candidatos ao desenvolvimento de protótipos. Dessa forma, futuros testes envolvendo tempo de prateleira, possibilidade de reutilização e miniaturização de componentes serão necessários.

- A efetividade obtida pelo sistema sensor Cys_AuNP-AMB_ClavA o coloca como alvo de futuros experimentos com não apenas outras espécies de bactérias, mas também com microrganismos como fungos, vírus e protozoários, o qual também são frequentes em casos de infecção hospitalar.
- Dessa forma, o biossensor proposto pode ser considerado uma excelente e inovadora alternativa para a detecção de microrganismos de interesse clínico tanto no ambiente hospitalar, visando a detecção rápida e posterior higienização local evitando infecções, quanto a análises ambientais.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. *et al.* Biosensors for whole-cell bacterial detection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 631–646, 2014.
- AHN, J. *et al.* Electrical immunosensor based on a submicron-gap interdigitated electrode and gold enhancement. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 12, p. 4690–4696, 2011.
- AITKEN, C.; JEFFRIES, D. J. Nosocomial Spread of Viral Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 528–46, 2001.
- ALASIA, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. n. 32, p. Modern Aspects of Electrochemistry, B. E. Conway, 1999.
- ALIOFKHAZRAEI, M.; MAKHLOUF, A. S. H. **Handbook of Nanoelectrochemistry**. [s.l.] Springer, 2016.
- ALLARA, D. Critical issues in applications of self-assembled monolayers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, p. 771–783, 1995.
- ALLEGIANZI, B.; PITTET, D. Healthcare-Associated Infection in Developing Countries: Simple Solutions to Meet Complex Challenges • . **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 12, p. 1323–1327, 2007.
- ALLEGIANZI, B.; PITTET, D. Role of hand hygiene in healthcare-associated infection prevention. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 305–315, 2009.
- ANDRADE, C. A. S. *et al.* Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2015.
- ANDRADE, D.; ANGERAMI, E. L. S. Reflexões acerca das infecções hospitalares às portas do terceiro milênio. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 32, p. 492–497, 1999.
- ANDRIENKO, D. Cyclic Voltammetry. **Cyclic Voltammetry**, p. 1–12, 2008.
- ARAKAWA, T. *et al.* Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 587–605, 2007.
- ARAUJO, E. A. *et al.* Colloidal Aspects of Bacterial Adhesion. **Quimica Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940–1948, 2010.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–78, 2012.
- ARYA, S. K. *et al.* Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2810–2817, 2009.

ATAR, N.; EREN, T.; YOLA, M. L. Ultrahigh capacity anode material for lithium ion battery based on rod gold nanoparticles decorated reduced graphene oxide. **Thin Solid Films**, v. 590, p. 156–162, 2015.

ATTA, N. F.; GALAL, A.; EL-ADS, E. H. A novel sensor of cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles for the selective determination of epinephrine in presence of sodium dodecyl sulfate. **The Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2658–68, 2012.

BAGOTSKY, V. S. **Fundamentals of Electrochemistry**. 2. ed. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION, 2006.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 2013.

BALA, P.; KUMAR, J. Antimicrobial Peptides: a Review. **Int. J. LifeSc. Bt& Pharm. Res**, v. 3, n. 1, p. 2250–3137, 2014.

BĂNICĂ, F. G. Dynamic Electrochemistry Transduction Methods. p. 1–56, 2012a.

Electrical Impedance-Based Sensors. *In*: **Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications**. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, INC., 2012b. p. 367–403.

BAPTISTA, P. *et al.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 3, p. 943–950, 2008.

BARD, A. J. Chemical Modification of Electrodes. **Journal of Chemical Education**, v. 13, n. 1980, p. 302–304, 1983.

Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. [s.l.: s.n.].

BAUER, H. H. Alternating current polarography and tensammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 1, p. 363–378, 1959.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Methods in Molecular Biology**, v. 618, p. 235–247, 2016.

BENETTI, F. *et al.* Gold nanoparticles: Role of size and surface chemistry on blood protein adsorption. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 6, 2013.

BEREKET, W. *et al.* Update on bacterial nosocomial infections. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 8, p. 1039–1044, 2012.

BERNASCONI, R. *et al.* Application of Self-Assembled Monolayers to the Electroless Metallization of High Aspect Ratio Vias for Microelectronics. **Journal of Electronic Materials**, v. 45, n. 10, p. 5449–5455, 2016.

BIGELOW, W. C.; PICKETT, D. L.; ZISMAN, W. A. Oleophobic monolayers. Films Adsorbed From Solution In Non-Polar Liquids. **Journal of Colloid**

Science, v. 1, n. 6, p. 513–538, 1946.

BLAKEY, I. *et al.* Interactions of phenyldithioesters with gold nanoparticles (AuNPs): Implications for AuNP functionalization and molecular barcoding of AuNP assemblies. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 692–701, 2010.

BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1759–1782, 2009.

BOMAN, H. G.; NILSSON, I.; RASMUSON, B. Inducible Antibacterial Defence System in *Drosophila*. **Nature**, v. 237, n. 5352, p. 232–235, 1972.

BRANDENBURG, L. O. *et al.* Antimicrobial peptides: Multifunctional drugs for different applications. **Polymers**, v. 4, n. 1, p. 539–560, 2012.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 3, p. 217–225, 2011.

BROWN, K. R.; NATAN, M. J. Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces. **Langmuir**, v. 14, n. 4, p. 726–728, 1998.

BROWN, S.; SANTA MARIA, J. P.; WALKER, S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 313–336, 2013.

BRUST, M. *et al.* Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, n. 7, p. 801–802, 1994.

CAJAVILCA, C.; VARON, J.; STERNBACH, G. L. Luigi Galvani and the foundations of electrophysiology. **Resuscitation**, v. 80, n. 2, p. 159–162, 2009.

CALFEE, D. P. *et al.* Strategies to Prevent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Transmission and Infection in Acute Care Hospitals: 2014 Update. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 35, n. 7, p. 772–96, 2014.

CANNON, M. J.; MYSZKA, D. G. Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. *In*: [s.l: s.n.]. v. 126p. 79–92.

CAO, X.; YE, Y.; LIU, S. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. **Analytical Biochemistry**, v. 417, n. 1, p. 1–16, 2011.

CARBALLAR-LEJARAZÚ, R. *et al.* Recombinant scorpine: A multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 19, p. 3081–3092, 2008.

CARNEIRO, V. A. *et al.* Antimicrobial peptides: from synthesis to clinical

perspectives. p. 81–90, 2015.

CARRASCOSA, L. G. *et al.* Nanomechanical biosensors: A new sensing tool. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 196–206, 2006.

CHANG, B. Y.; PARK, S. M. Electrochemical impedance spectroscopy. **Annual review of analytical chemistry**, v. 3, p. 207–229, 2010.

CHANG, M.-S. *et al.* Efficient detection of Escherichia coli O157:H7 using a reusable microfluidic chip embedded with antimicrobial peptide-labeled beads. **The Analyst**, v. 140, n. 23, p. 7997–8006, 2015.

CHEN, P. C.; MWAKWARI, S. C.; OYELERE, A. K. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. **Nanotechnology Science and Applications**, v. 1, p. 45–66, 2008.

CHEN, Y. *et al.* Electronic detection of bacteria using holey reduced graphene oxide. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 6, p. 3805–10, 2014.

CHIKERE, C. B.; OMONI, V. T.; CHIKERE, B. O. Distribution of potential nosocomial pathogens in a hospital environment. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3535–3539, 2008.

CHU, H.-L. *et al.* Novel Antimicrobial Peptides with High Anticancer Activity and Selectivity. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. 1–14, 2015.

CHUANG, M.-K. *et al.* Gold nanoparticle-decorated graphene oxides for plasmonic-enhanced polymer photovoltaic devices. **Nanoscale**, v. 6, n. 207890, p. 1573–9, 2014.

CLARK, L. C. Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. **American Society for Artificial Internal Organs**, v. 2, p. 41–446, 1956.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962.

COMPTON, R. G.; LABORDA, E.; WARD, K. R. **Understanding Voltammetry: Simulation of Electrode Processes**. [s.l: s.n.].

CORNEJO-JUÁREZ, P. *et al.* The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 31, p. e31–e34, 2015.

CORTI, C.; HOLLIDAY, R. **Gold: Science and Applications**. [s.l: s.n.].

COSTA, M. P. *et al.* Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 433, p. 141–148, 2014.

CRUZ, J. *et al.* Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 20, p.

2299–321, 2014.

D'ALESSANDRO, S.; TULLIO, V.; GIRIBALDI, G. Beyond Lysozyme: Antimicrobial Peptides Against Malaria. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 91–101.

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. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970–979, 2004.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

DARAEI, H. *et al.* Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 1401, n. August, p. 1–13, 2014.

DAS, P. *et al.* Biosensors and Bioelectronics Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 386–397, 2016.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 71–87, 1999.

DELAHAY, P. Double Layer and Electrode Kinetics. v. 280, n. 4, 1965.

DICKSON, J. S.; KOOHMARAIE, M.; HRUSKA, R. L. Cell Surface Charge Characteristics and Their Relationship to Bacterial Attachment to Meat Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 832–836, 1989.

DING, W. *et al.* Sensitive Hydrazine Electrochemical Biosensor Based on a Porous Chitosan–Carbon Nanofiber Nanocomposite Modified Electrode. **Analytical Letters**, v. 48, n. 10, p. 1551–1569, 2015.

DONG, Z.-M.; ZHAO, G.-C. Label-free detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. **Talanta**, v. 137, p. 55–61, 2015.

DORIA, G. *et al.* Noble metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, v. 12, n. 2, p. 1657–1687, 2012.

DREADEN, E. C. *et al.* The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2740, 2012.

DUCEL, G.; FABRY, J.; NICOLLE, L. Prevention of hospital-acquired infections. **World Health Organization**, p. 1–64, 2002.

DUWEZ, A. S. **Exploiting electron spectroscopies to probe the structure and organization of self-assembled monolayers: A review**. [s.l.: s.n.]. v. 134

DYKMAN, L.; KHLEBTSOV, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. **Chemical Society reviews**, v. 41, n. 6, p. 2256–2282, 2012.

EBENHAN, T. *et al.* Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed research international**, v. 2014, p. 867381, 2014.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 1, p. 140–144, 1984.

ETAYASH, H. *et al.* Impedimetric detection of pathogenic gram-positive bacteria using an antimicrobial peptide from class IIa bacteriocins. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 1693–1700, 2014.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society reviews**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006.

FALANGA, A. *et al.* Marine antimicrobial peptides: Nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. W. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Indolicidin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19298–19303, 1996.

FARGHALY, O. A.; HAMEED, R. S. A.; ABU-NAWWAS, A.-A. H. Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 2014, p. 3287–3318, 2014.

FARIDBOD, F.; NOROUZI, P.; GANJALI, M. R. Principles of Electroanalytical Methods. *In*: BARBOOTI, M. (Ed.). **Environmental Applications of Instrumental Chemical Analysis**. [s.l.] Apple Academic Press, 2015. p. 137–186.

FEDOROV, R. G.; MANDLER, D. Effect of Self-Assembled Monolayers on the Locally Electrodeposited Silver Thin Layers. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 29, p. 15608–15617, 2016.

FELICIANO-RAMOS, I. *et al.* Self-assembled monolayers of L-cysteine on palladium electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 650, n. 1, p. 98–104, 2010.

FERNÁNDEZ-GRACIA, J. *et al.* Influence of a patient transfer network of US inpatient facilities on the incidence of nosocomial infections. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 2930, 2017.

FERNÁNDEZ-VIDAL, M. *et al.* Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. **Journal of molecular biology**, v. 370, n.

3, p. 459–470, 2007.

FERRETTI, S. *et al.* Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 530–540, 2000.

FONTANA, R. T. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 59, n. 5, p. 703–706, 2006.

FRANCO, R. *et al.* Gold Nanoparticles for DNA/RNA-Based Diagnostics. **Handbook of Nanoparticles**, p. 1–25, 2015.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20–22, 1973.

GADSBY, N. J. *et al.* Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 8, p. e788.e1-788.e13, 2015.

GALAL, A.; ATTA, N. F.; EL-ADS, E. H. Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles - Towards selective electrochemical sensors. **Talanta**, v. 93, p. 264–273, 2012.

GARRIDO, C. *et al.* Gold nanoparticles to improve HIV drug delivery. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 450–461, 2015.

GE, X. *et al.* Lanthanide (Gd³⁺ and Yb³⁺) functionalized gold nanoparticles for in vivo imaging and therapy. **Biomaterials**, v. 108, p. 35–43, 2016.

GENG, P. *et al.* Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 14, p. 4663–4668, 2008.

GEORGANOPOULOU, D. G. *et al.* Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2273–6, 2005.

GHOSH, S. K.; PAL, T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4797–4862, 2007.

GILJOHANN, D. A. *et al.* Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 19, p. 3280–3294, 2010.

GONDIKAS, A. P. *et al.* Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: Implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7037–7045, 2012.

GRIESHABER, D. *et al.* Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and

Architectures. **Journal Of Applied Biomedicine**, n. January, p. 57–64, 2008.

GSCHNEIDTNER, T.; MOTH-POULSEN, K. Self-Assembly at Interfaces. **Handbook of Single-Molecule Electronics**, p. 205–232, 2015.

GULABOSKI, R.; PEREIRA, C. M. Electrochemical Techniques and Instrumentation in Food Analysis. *In*: **Handbook of Food Analysis Instruments**. [s.l.: s.n.]. .

GUPTA, R.; SRIVASTAVA, S. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. **Food Microbiology**, v. 42, p. 1–7, 2014.

HÄKKINEN, H. The gold–sulfur interface at the nanoscale. **Nature Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 443–455, 2012.

HAMMERICH, O.; SPEISER, B. Techniques for Studies of Electrochemical Reactions in Solution. *In*: **Organic Electrochemistry**. [s.l.] CRC Press LLC, 2015. p. 96–198.

HAMZA, S.; IGNASZAK, A.; KIANI, A. Synthesis of Electrical Conductive Silica Nanofiber/Gold Nanoparticle Composite by Laser Pulses and Sputtering Technique. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, 2017.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide Antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–7, 2006.

HASSAN, M. *et al.* Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 4, p. 723–736, 2012.

HASSAN, S. S. M.; EL-BAZ, A. F.; ABD-RABBOH, H. S. M. A novel potentiometric biosensor for selective l-cysteine determination using l-cysteine-desulfhydrase producing *Trichosporon jirovecii* yeast cells coupled with sulfide electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 602, n. 1, p. 108–113, 2007.

HEINZE, J. Cyclic Voltammetry—“Electrochemical Spectroscopy”. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 23, n. 11, p. 831–847, 1984.

HOLT, A.; KILLIAN, J. A. Orientation and dynamics of transmembrane peptides: The power of simple models. **European Biophysics Journal**, v. 39, n. 4, p. 609–621, 2010.

HOSEIN, I. K. *et al.* Summertime *Bacillus cereus* colonization of hospital newborns traced to contaminated, laundered linen. **Journal of Hospital Infection**, v. 85, n. 2, p. 149–154, 2013.

HOYOS-NOGUÉS, M. *et al.* Impedimetric antimicrobial peptide-based sensor for the early detection of periodontopathogenic bacteria. **Biosensors and**

Bioelectronics, v. 86, p. 377–385, 2016.

HUAYHUAS-CHIPANA, B. C.; GOMERO, J. C. M.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Nanostructured screen-printed electrodes modified with self-assembled monolayers for determination of metronidazole in different matrices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 1737–1745, 2014.

IMAMURA, T. *et al.* Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin. **Transgenic research**, v. 19, n. 3, p. 415–424, 2010.

ISHIDA, Y. *et al.* Thiolate–Protected Gold Nanoparticles Via Physical Approach: Unusual Structural and Photophysical Characteristics. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 29928, 2016.

JANA, N. R. *et al.* Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. **Advanced Materials**, v. 13, n. 18, p. 1389–1393, 2001.

JIANG, K. *et al.* Rapid label-free detection of *E. coli* using antimicrobial peptide assisted impedance spectroscopy. **Anal. Methods**, v. 7, n. 23, p. 9744–9748, 2015.

KAN, E. J. M. VAN *et al.* Clavanin permeabilizes target membranes via two distinctly different pH-dependent mechanisms. **Biochemistry**, v. 41, n. 24, p. 7529–7539, 2002.

KAN, E. J. M. VAN *et al.* The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1615, n. 1–2, p. 84–92, 2003.

KAN, E. J. M. VAN *et al.* The peptide antibiotic clavanin A interacts strongly and specifically with lipid bilayers. **Biochemistry**, v. 42, n. 38, p. 11366–11372, 2003.

KATAYAMA, Y. *et al.* Detection of influenza virus by a biosensor based on the method combining electrochemiluminescence on binary SAMs modified Au electrode with an immunoliposome encapsulating Ru (II) complex. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 22, p. 5963–5971, 2016.

KHAN, H. A.; AHMAD, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 509–514, 2015.

KIM, M. *et al.* From Self-Assembled Monolayers to Coatings: Advances in the Synthesis and Nanobio Applications of Polymer Brushes. **Polymers**, v. 7, p. 1346–1378, 2015.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. Cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 9242–5, 1983.

KNECHT, M. R.; WALSH, T. R. **Bio-Inspired Nanotechnology: From Surface Analysis to Applications**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2014.

KOGIKOSKI, S. *et al.* Multifunctional biosensors based on peptide– polyelectrolyte conjugates. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 18, n. 4, p. 3223–3233, 2016.

KREYSA, G.; OTA, K.; SAVINELL, R. F. **Encyclopedia of Applied Electrochemistry**. New York: Springer, 2014.

KULAGINA, N. V. *et al.* Antimicrobial peptides for detection of bacteria in biosensor assays. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 6504–6508, 2005.

KUMAR, A.; DASH, S. K.; SHARMA, D. P. DNA Based Biosensors for Detection of Pathogens. *In: Plant Fungal Disease Management*. [s.l: s.n.]. p. 31–35.

KUMAR, P.; ROY, I. Applications of Gold Nanoparticles in Medicine. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 7, p. 9–16, 2016.

KUMERIA, T.; SANTOS, A. **Sensing and Biosensing Applications of Nanoporous Anodic Alumina**. [s.l: s.n.]. v. 220

KUNDU, S. *et al.* Anisotropic growth of gold clusters to gold nanocubes under UV irradiation. **Nanotechnology**, v. 18, p. 2–3, 2007.

LANG, P.; MOTTAGHI, D.; LACAZE, P. C. On the relationship between the structure of self-assembled carboxylic acid monolayers on alumina and the organization and electrical properties of a pentacene thin film. **Applied Surface Science**, v. 365, n. December 2015, p. 364–375, 2016.

LEE, I. H. *et al.* Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. **FEBS Letters**, v. 400, n. 2, p. 158–162, 1997.

LI, W. *et al.* Gold Nanoparticle–Mediated Targeted Delivery of Recombinant Human Endostatin Normalizes Tumour Vasculature and Improves Cancer Therapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 30619, 2016.

LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.

LI, Y. *et al.* Electrochemical determination of trace lead(II) with enhanced sensitivity and selectivity by three-dimensional nanoporous gold leaf and self-assembled homocysteine monolayer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 758, n. October, p. 78–84, 2015.

LI, Y.; SCHLUESENER, H.; XU, S. Gold nanoparticle-based biosensors. **Gold Bulletin**, v. 43, n. 1, p. 29–41, 2010.

LI, Z. *et al.* An organosilane self-assembled monolayer incorporated into polymer solar cells enabling interfacial coherence to improve charge transport. **The Royal Society of Chemistry**, v. 18, n. 23, p. 16005–16012, 2016.

LI VOLSI, A. *et al.* Inulin coated plasmonic gold nanoparticles as a tumor-selective tool for cancer therapy. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 6, p. 1150–1155,

2016.

LILLEHOJ, P. B. *et al.* Rapid, Electrical Impedance Detection of Bacterial Pathogens Using Immobilized Antimicrobial Peptides. **Journal of Laboratory Automation**, v. 19, n. 1, p. 42–49, 2013.

LIN, M. C. *et al.* Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer activity and antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Peptides**, v. 44, p. 139–148, 2013.

LIN, Y. T. *et al.* Community-onset *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in Taiwan: Clinical features of the disease and associated microbiological characteristics of isolates from pneumonia and nasopharynx. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 1–8, 2015.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 2008.

LIU, Q. *et al.* Cell-based biosensors and their application in biomedicine. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 12, p. 6423–6461, 2014.

LIU, S.; LEECH, D.; JU, H. Application of Colloidal Gold in Protein Immobilization, Electron Transfer and Biosensing. **Analytical letters**, v. 36, n. 1, p. 1–19, 2003.

LODISH, H. *et al.* **Molecular Cell Biology**. 5. ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2008.

LÓPEZ, M. M. *et al.* Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current issues in molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 13–46, 2009.

LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990–2042, 2015.

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**, v. 220, p. 565–572, 2015.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: Technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 492–500, 2008.

LUQUE-ORTEGA, J. R. *et al.* Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 1, p. 1817–1828, 2008.

LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Nanomaterials for Biosensors and Implantable Biodevices. *In*: **Nanobioelectrochemistry: From Implantable Biosensors to Green Power Generation**. [s.l.: s.n.]. p. 1–137.

- LVOVICH, V. F. Impedance Analysis of Complex Systems. **Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena**, p. 113–161, 2012.
- LY, T. N.; PARK, S.; PARK, S. J. Detection of HIV-1 antigen by quartz crystal microbalance using gold nanoparticles. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 237, n. July, p. 452–458, 2016.
- LYUBARSKAYA, Y. L. **Tuning Surface Properties Using Self-Assembled Monolayers for Various Applications Submitted**. [s.l.] University of Rochester, 2014.
- MA, M. *et al.* Highly-ordered perpendicularly immobilized FWCNTs on the thionine monolayer-modified electrode for hydrogen peroxide and glucose sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 477–484, 2015.
- MACDONALD, J. R.; JOHNSON, W. B. Fundamentals of impedance spectroscopy. *In: Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. [s.l.: s.n.]. v. 2p. 1–26.
- MACIEL, C. C. S.; CÂNDIDO, H. R. L. F. Infecção hospitalar: principais agentes e drogas administradas. **Veredas Favip**, v. 3, n. 1, p. 33–43, 2010.
- MACKAY, S. *et al.* Simulations of interdigitated electrode interactions with gold nanoparticles for impedance-based biosensing applications. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 9, p. 22192–22208, 2015.
- MANNOOR, M. S. *et al.* Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 45, p. 19207–19212, 2010.
- MARKEN, F.; NEUDECK, A.; BOND, A. M. Cyclic Voltammetry. *In: Electroanalytical Methods*. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 57–106.
- MARÓTI GERGELY, G. *et al.* Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 363–374, 2011.
- MEHRAD, B. *et al.* Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. **Chest**, v. 147, n. 5, p. 1413–1421, 2015.
- MELAMED, J. R. *et al.* Using Gold Nanoparticles to Disrupt the Tumor Microenvironment: An Emerging Therapeutic Strategy. **ACS Nano**, v. 10, n. 12, p. 10631–10635, 2016.
- MITRA, R. N.; DAS, P. K. In situ preparation of gold nanoparticles of varying shape in molecular hydrogel of peptide amphiphiles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 22, p. 8159–8166, 2008.
- MIZUTANI, F. Biosensors utilizing monolayers on electrode surfaces. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 130, n. 1, p. 14–20, 2008.
- MOCANU, A. *et al.* Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the

presence of cysteine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 338, n. 1–3, p. 93–101, 2009.

MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Bean sprout peroxidase biosensor based on L-cysteine self-assembled monolayer for the determination of dopamine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 133, n. 2, p. 364–369, 2008.

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.

MOSSANHA, R. *et al.* Mixed Self-Assembled Monolayers of Mercaptoundecanoic Acid and Thiolactic Acid for the Construction of an Enzymatic Biosensor for Hydroquinone Determination. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 162, n. 7, p. B145–B151, 2015.

MOURA, M. E. B. *et al.* Infecção hospitalar no olhar de enfermeiros portugueses: representações sociais. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 17, n. 4, p. 743–749, 2008.

MOUT, R. *et al.* Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2539, 2012.

MUKDASAI, S. *et al.* A highly sensitive electrochemical determination of norepinephrine using L-cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 236, p. 126–135, 2016.

MURNI, I. *et al.* Prevention of nosocomial infections in developing countries, a systematic review. **Paediatrics and international child health**, v. 33, n. 2, p. 61–78, 2013.

MURPHY, C. J. *et al.* Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. **Accounts Of Chemical Research**, v. 41, n. 12, 2008.

MUTHUKUMAR, A.; ZITTERKOPF, N. L.; PAYNE, D. Molecular Tools for the Detection and Characterization of Bacterial Infections: A Review. **Laboratory Medicine**, v. 39, n. 7, p. 430–436, 2008.

NASCIMENTO, J. M. *et al.* Elucidation of mechanisms of interaction of a multifunctional peptide Pa-MAP with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 11, p. 2899–2909, 2014.

NAZIR, A.; KADRI, S. An overview of hospital acquired infections and the role of the microbiology laboratory. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 21, 2014.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.

- NICOL, J. R.; DIXON, D.; COULTER, J. A. Gold nanoparticle surface functionalization: a necessary requirement in the development of novel nanotherapeutics. **Nanomedicine**, v. 10, n. 8, p. 1315–1326, 2015.
- NICOLARDI, S. *et al.* Structural Characterization of Biofunctionalized Gold Nanoparticles by Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry. **ACS Nano**, p. acsnano.7b03402, 2017.
- NJOKI, P. N. *et al.* Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. **J. Phys. Chem. C**, v. 111, p. 14664–14669, 2007.
- NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. **Journal of American Chemical Society**, v. 105, n. 13, p. 4481–4483, 1983.
- NYAMOGOBA, H.; OBALA, A. A. Nosocomial infections in developing countries: cost effective control and prevention. **East African Medical Journal**, v. 79, n. 8, p. 435–441, 2002.
- OH, S. Y. *et al.* Development of gold nanoparticle-aptamer-based LSPR sensing chips for the rapid detection of *Salmonella typhimurium* in pork meat. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10130, 2017.
- OLIVEIRA, M. *et al.* Mechanistic Aspects of Peptide-Membrane Interactions Determined by Optical, Dielectric and Piezoelectric Techniques: An Overview. **Current Protein & Peptide Science**, v. 14, n. 7, p. 543–555, 2013.
- OLIVEIRA, M. D. L. *et al.* Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 1, p. 194–201, 2011.
- OLSON, M. P.; LACOURSE, W. R. Voltammetry. **Analytical Instrumentation Handbook, Third Edition**. CRC Press, p. 529–543, 2004.
- ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. Electrochemical Impedance Spectroscopy. **The Electrochemical Society**, v. 2, 2011.
- ORENDORFF, C. J.; SAU, T. K.; MURPHY, C. J. Shape-dependent plasmon-resonant gold nanoparticles. **Small**, v. 2, n. 5, p. 636–639, 2006.
- OSIPOVICH, N. *et al.* Cyclic voltammetry as a sensitive method for in-situ probing of chemical transformations in quantum dots. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 18, p. 1–6, 2016.
- OU, G. *et al.* Photothermal therapy by using titanium oxide nanoparticles. **Nano Research**, v. 9, n. 5, p. 1236–1243, 2016.
- OUERGHI, O. *et al.* Adjunction of Avidin to a Cysteamine Self-Assembled Monolayer for Impedimetric Immunosensor. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 7, n. January, p. 1–12, 2016.
- PACHECO, W. F. *et al.* Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos.

Revista Virtual de Química, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAIK, T. *et al.* Binary and Ternary Superlattices Self-Assembled from Colloidal Nanodisks and Nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 20, p. 6662–6669, 2015.

PANÁČEK, A. *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 142, p. 1–28, 2016.

PARACHIN, N. S. *et al.* Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 446–456, 2012.

PATIL, B. *et al.* Direct electrochemistry and intramolecular electron transfer of ascorbate oxidase confined on L-cysteine self-assembled gold electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 95, p. 15–22, 2014.

PATSKOVSKY, S. *et al.* Wide-field hyperspectral 3D imaging of functionalized gold nanoparticles targeting cancer cells by reflected light microscopy. **Journal of Biophotonics**, v. 8, n. 5, p. 401–407, 2015.

PAUL, J. *et al.* Lubrication of Individual Microcontacts by a Self-Assembled Alkyl Phosphonic Acid Monolayer on α -Al₂O₃(0001). **Langmuir**, v. 32, n. 33, p. 8298–8306, 2016.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 2011.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 4–7, 2010.

PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 19, p. 5848–5866, 2008.

PITTET, D. *et al.* Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **Journal of Hospital Infection**, v. 68, n. 4, p. 285–292, 2008.

PITTET, D.; ALLEGRANZI, B.; BOYCE, J. M. The World Health Organization Guidelines on Hand Hygiene in Health Care and their consensus recommendations. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 30, n. 7, p. 611–22, 2009.

PITTET, D.; DONALDSON, L. Clean Care is Safer Care: A worldwide priority. **Lancet**, v. 366, n. 9493, p. 1246–1247, 2005.

PUTKER, F.; BOS, M. P.; TOMMASSEN, J. Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 985–1002, 2015.

PYRPASSOPOULOS, S. *et al.* Synthesis and self-organization of Au nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, p. 485604, 2007.

QINGWEN, L. *et al.* Studies on self-assembly monolayers of cysteine on gold by XPS, QCM, and electrochemical techniques. **Electroanalysis**, v. 13, n. 16, p. 1342–1346, 2001.

RADHAKRISHNAN, R. *et al.* **Impedance Biosensor Incorporating a Carboxylate-Terminated Bidentate Thiol for Antibody Immobilization.** [s.l.: s.n.]. v. 163

RAJANBABU, V.; CHEN, J.; WU, J. Antimicrobial Peptides from Marine Organisms. *In: Springer Handbook of Marine Biotechnology.* [s.l.: s.n.]. p. 747–758.

RAKA, L. *et al.* Prevalence of nosocomial infections in high-risk units in the university clinical center of Kosova. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 4, p. 421–423, 2006.

RAM, Y. *et al.* Impact of Molecular Surface Charge on Biosensing by Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 200, p. 161–167, 2016.

RAMADURAI, S. *et al.* Influence of hydrophobic mismatch and amino acid composition on the lateral diffusion of transmembrane peptides. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 5, p. 1447–1454, 2010.

RAZMI, H.; MOHAMMAD-REZAEI, R. Graphene quantum dots as a new substrate for immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase: Application to sensitive glucose determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 498–504, 2013.

REED, D.; KEMMERLY, S. A. Infection control and prevention: a review of hospital-acquired infections and the economic implications. **The Ochsner journal**, v. 9, n. 1, p. 27–31, 2009.

REN, W. *et al.* A reusable and label-free supersandwich biosensor for sensitive DNA detection by immobilizing target-triggered DNA concatamers on ternary self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 223, p. 24–29, 2016.

RENGAN, A. K. *et al.* In vivo analysis of biodegradable liposome gold nanoparticles as efficient agents for photothermal therapy of cancer. **Nano Letters**, v. 15, n. 2, p. 842–848, 2015.

RICHARD, V. *et al.* Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 783–785, 1988.

- SAHA, K. *et al.* Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical reviews**, v. 112, p. 2739–2779, 2012.
- SALEEM, M. Biosensors a promising future in measurements. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 51, p. 12012, 2013.
- SAMANTA, D.; SARKAR, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. **Chemical Society reviews**, v. 40, n. 5, p. 2567–2592, 2011.
- SAU, T. K. *et al.* Properties and applications of colloidal nonspherical noble metal nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 22, n. 16, p. 1805–1825, 2010.
- SCHLICKE, H.; SCHRÖTER, C. J.; VOSSMEYER, T. Electrostatically driven drumhead resonators based on freestanding membranes of cross-linked gold nanoparticles. **Nanoscale**, v. 8, p. 183–186, 2016.
- SCHOLZ, F. **Electroanalytical Methods**. [s.l.] Berlin-Heidelberg: Springer, 2010a.
- Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications. *In*: RETTER, U.; LOHSE, H. (Eds.). . **Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2010b. p. 159–177.
- Voltammetric techniques of analysis: the essentials. **ChemTexts**, v. 1, n. 4, p. 17, 2015.
- SCHWARTZ, O.; BERCOVICI, M. Microfluidic assay for continuous bacteria detection using antimicrobial peptides and isotachopheresis. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 20, p. 10106–10113, 2014.
- SCOGNAMIGLIO, V. *et al.* Application of Biosensors for Environmental Analysis. *In*: **Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment**. [s.l.: s.n.]. p. 395–434.
- SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2767–2781, 2012.
- SEO, M.-D. *et al.* Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276–12286, 2012.
- SHAMSIPUR, M. *et al.* Highly sensitive gold nanoparticles-based optical sensing of DNA hybridization using bis(8-hydroxyquinoline-5-sulphonate)cerium(III) chloride as a novel fluorescence probe. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p. 356–362, 2016.
- SHI, J.; PORTERFIELD, D. M. Surface Modification Approaches for Electrochemical Biosensors. *In*: **INTECH Open Access Publisher**. [s.l.: s.n.]. p. 209–226.
- SHOURIAN, M.; GHOURCHIAN, H.; BOUTORABI, M. Ultra-sensitive immunosensor for detection of hepatitis B surface antigen using multi-

- functionalized gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 895, p. 1–11, 2015.
- SILVA, O. N. *et al.* Structural Studies of a Lipid-Binding Peptide from Tunicate Hemocytes with Anti-Biofilm Activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 27128, 2016.
- SIMÃO, E. P. *et al.* Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1040–1047, 2016.
- SIN, M. L. *et al.* Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. **Hospital practice**, v. 14, n. 2, p. 225–244, 2014.
- SINGH, A. *et al.* Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512–530, 2006.
- SIRIJAN, S.; NITAYA, I. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria in ESKAPE pathogens. **Control**, v. 2016, 2006.
- SOOD, S. *et al.* Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 2, p. 111–121, 2008.
- STREMPEL, N.; STREHMEL, J.; OVERHAGE, J. Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 67–84, 2015.
- SUN, M. *et al.* Salt-induced aggregation of gold nanoparticles for photoacoustic imaging and photothermal therapy of cancer. **Nanoscale**, v. 8, n. 8, p. 4452–4457, 2016.
- SUN, Y.; MAYERS, B.; XIA, Y. Metal Nanostructures with Hollow Interiors. **Advanced Materials**, v. 15, n. 78, p. 641–646, 2003.
- TADROS, T. **Encyclopedia of Colloid and Interface Science**. [s.l.: s.n.].
- TAKAHASHI, D. *et al.* Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. **Biochimie**, v. 92, n. 9, p. 1236–1241, 2010.
- TANIMOTO, S.; ICHIMURA, A. Discrimination of inner- and outer-sphere electrode reactions by cyclic voltammetry experiments. **Journal of Chemical Education**, v. 90, n. 6, p. 778–781, 2013.
- TEIXEIRA, L. M. *et al.* Enterococcus. *In*: **Molecular Typing in Bacterial Infections**. [s.l.: s.n.]. p. 350–364.
- TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–177, 2012.
- TENENBAUM, E.; SEGAL, E. Optical biosensors for bacteria detection by a peptidomimetic antimicrobial compound. **The Analyst**, v. 140, n. 22, p. 7726–

33, 2015.

TERATO, K. *et al.* Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. **Journal of Immunological Methods**, v. 407, p. 15–25, 2014.

TESH, S. J.; SCOTT, T. B. Iron Nanoparticles for Water Treatment: Is the Future Free or Fixed? *In: Iron Oxides: From Nature to Applications*. [s.l.: s.n.]. p. 473–522.

THOMAS, F. G.; HENZE, G. **Introduction to Voltammetric Analysis: Theory and Practice**. [s.l.: s.n.].

TIWARI, P. M. *et al.* Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 1, n. 1, p. 31–63, 2011.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. **Peptide Science**, v. 55, n. 1, p. 4–30, 2000.

TURKEVICH, J.; COOPER, P.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 55, n. c, p. 55–75, 1951.

TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184, 2013.

UEMATSU, N.; MATSUZAKI, K. Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: a model peptide study. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 4, p. 2075–2083, 2000.

ULMAN, A. **An introduction to ultrathin organic films from Langmuir-Blodgett to self-assembly**. [s.l.: s.n.]. v. 147

Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 1996.

VELUSAMY, V. *et al.* An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 2, p. 232–254, 2010.

VERMA, J.; SAXENA, S.; BABU, S. G. ELISA-Based Identification and Detection of Microbes. *In: Analyzing Microbes: Manual of Molecular Biology Techniques*. [s.l.: s.n.]. p. 169–1833.

VERNET, G. *et al.* Surveillance for antimicrobial drug resistance in under-resourced countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 434–441, 2014.

VIDANA, R. *et al.* Potential for nosocomial transmission of *Enterococcus faecalis* from surfaces in dental operatories. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 6, p. 518–527, 2015.

WANG, B. *et al.* Label-free electrochemical impedance peptide-based biosensor for the detection of cardiac troponin I incorporating gold nanoparticles modified carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, p. 6–11, 2016.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic acids research**, v. 44, n. November 2015, p. D1087–D1093, 2016.

WANG, H. *et al.* Preparation of amperometric glucose biosensor based on 4-mercaptobenzoic acid. **Physics Procedia**, v. 14, p. 2–6, 2011.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. [s.l: s.n.]. v. 3

Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **The Analyst**, v. 130, n. 4, p. 421, 2005.

WANG, X. *et al.* Highly sensitive electrogenerated chemiluminescence biosensor based on hybridization chain reaction and amplification of gold nanoparticles for DNA detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 942–948, 2015.

WEINSTEIN, R. A.; GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 848–854, 2005.

WHO. Hand Hygiene in Health Care First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care. **World Health**, v. 30, n. 1, p. 270, 2009.

WILSON, R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 2028–2045, 2008.

WITTENBERG, N. J.; HAYNES, C. L. Using nanoparticles to push the limits of detection. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 2, p. 237–254, 2009.

WOLFBEIS, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, n. 44, p. 4743–4768, 2015.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59, n. SUPPL. 1, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, p. 40, 2011.

WU, J.; YUAN, X.-Z.; WANG, H. Cyclic Voltammetry. **PEM Fuel Cell Diagnostic Tools**. CRC Press, n. In: Li, Hui (Ed.), p. 71–85, 2011.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 4, p. 884–886, 2005.

- 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**, v. 229, p. 297–304, 2016.
- YANG, S. PEN *et al.* A risk factor analysis of healthcare-associated fungal infections in an intensive care unit: a retrospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 10, 2013.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.
- YEH, Y.-C.; CRERAN, B.; ROTELLO, V. M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. **Nanoscale**, v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012.
- YIN, L. M. *et al.* Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 10, p. 7738–7745, 2012.
- YODMONGKOL, S. *et al.* Application of surface plasmon resonance biosensor for the detection of *Candida albicans*. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 55, n. 2, 2016.
- YOUNT, N. Y. *et al.* Advances in Antimicrobial Peptide Immunobiology. **Wiley InterScience**, v. 84, p. 435–458, 2006.
- YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Peptide antimicrobials: Cell wall as a bacterial target. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 127–138, 2013.
- YUSOFF, N. *et al.* Gold nanoparticle based optical and electrochemical sensing of dopamine. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 13–14, p. 2091–2114, 2015.
- ZELEZETSKY, I. *et al.* Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and cell specificity. **The Biochemical journal**, v. 390, n. Pt 1, p. 177–188, 2005.
- ZHANG, P. *et al.* Nanoporous ionic organic networks: Stabilizing and supporting gold nanoparticles for catalysis. **Nano Letters**, v. 15, n. 2, p. 823–828, 2015.
- ZHANG, S.; CARDONA, C. M.; ECHEGOYEN, L. Ion recognition properties of self-assembled monolayers (SAMs). **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 43, p. 4461–4473, 2006.
- ZHAO, C. *et al.* cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. **FEBS Letters**, v. 412, n. 1, p. 144–148, 1997.
- ZHOU, W. *et al.* Gold Nanoparticles for in Vitro Diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10575–10636, 2015.
- ZIEBUHR, W. *et al.* Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of**

Antimicrobial Agents, v. 28, n. SUPPL. 1, p. 14–20, 2006.

APÊNDICE A - A SIMPLE NANOSTRUCTURED IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED ON CLAVANIN A PEPTIDE FOR BACTERIAL DETECTION

A SIMPLE NANOSTRUCTURED IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED ON CLAVANIN A PEPTIDE FOR BACTERIAL DETECTION

Alberto G. da Silva Junior^{1,2}, Maria D.L. Oliveira^{1,2}, Idjane S. Oliveira³, Reginaldo G.
Lima-Neto⁴, Sandra R. Sá², Octávio L. Franco^{5,6}, César A.S. Andrade^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901
Recife, PE, Brazil

²Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal
de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, 55608-680 Vitória de Santo Antão,
PE, Brazil

⁴Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de
Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁵Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Pos-Graduação em Ciências Genômicas e
Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

⁶S-Inova Biotech, Pos-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, MS, 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: cstrandrade@gmail.com

ABSTRACT

The present work reports the development of an electrochemical biosensor based on Clavanin A (ClavA) peptide. ClavA is an antimicrobial peptide isolated from marine tunicate *Styela clava*. ClavA is able to differentiate between Gram-negative and positive bacteria. The electrode surface was modified with self-assembled monolayers of cysteine (Cys) associated to chemically modified gold nanoparticles with 4-mercaptopbenzoic acid and ClavA. Electrochemical biosensors have inherent advantages for medical diagnosis due to their high sensitivity, specificity, low detection limits, miniaturization and small analyte volumes. Pathogenic microorganism detection is a fast-growing market due to the increasing number of cases associated with multiresistant bacteria in developing countries. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were used to evaluate the electrochemical behavior of the biosensor. Ferri-ferrocyanide couple was used as redox pair. The bacteria identification testing was performed using *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Atomic force microscopy images revealed an effective immobilization of the nanostructured platform on the electrode surface. The electrochemical response decreased with increasing bacteria concentration. A detection limit ranging from 10^1 to 10^7 CFU.mL⁻¹ was obtained. The variation in the impedimetric response of the sensor is attributed to the bacterial wall peptidoglycan layer. The nanostructured biosensor was capable to differentiate between Gram-positive and Gram-negative bacteria. The proposed biosensor can be considered as an alternative to bacterial detection techniques.

Keywords: Impedance spectroscopy; cyclic voltammetry; gold nanoparticles; Clavanin A; bacteria.

1. Introduction

Nosocomial infections are a growing public health problem that can occur during hospital care or shortly after discharge from the patient [1]. Data suggest that about 1.7 million and 4 million people are infected by microorganisms annually in the USA and Europe, respectively [2]. Moreover, pathogenic bacteria could be found in many different sources. The ESKAPE pathogens (*Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter species*) are a leading cause of nosocomial infections worldwide [3].

Gram-negative bacteria belongs to Enterobacteriaceae family (e.g. *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium*). Gram-negative bacteria are recognized as precursors of infections through colonization of catheters and resistance to antibiotics [4,5]. In addition, antimicrobial resistance is also observed for Gram-positive bacteria as *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* [6,7].

In spite of the traditional methods effectively detect microorganisms, some notorious problems are observed. For example, traditional methods require ~2-3 days to obtain the first results and up to 7-10 days for confirmation [8]. On the other hand, new technological methods are associated to skilled labor, pre-treatment of samples, high cost equipment and expensive reagents [9].

Biosensors are an innovative alternative for detecting microorganisms due to their accuracy and rapid detection. Biosensors are composed of an active sensing element (peptides, antibodies, enzymes, DNA fragments, cells, etc.) responsible for the analyte specificity [10] and a transducer to convert the recognition into a detectable electrical signal [11]. Amino acids are essential molecules in the metabolism and have been used in the development of new biodevices [12]. Cysteine (Cys) is an amino acid composed of

amine, carboxyl and thiol groups [13]. Therefore, the basic structure of Cys is attractive in the development of biosensors. Cys is capable of self-assembly since it binds strongly to gold through Au-S binding [14].

Gold nanoparticles (AuNPs) have been used to immobilize several biomolecules since provides an exceptional electron transfer between analyte and electrode surface enhancing the sensibility [15]. AuNPs have been subject of intensive studies due to their applicability in drug delivery [16], sensory probes [17], therapeutic agents [18], photovoltaics [19], catalysis [20], electronic conductors [21], batteries [22] and biomedical devices [23]. In addition, modified AuNPs have extensive applications on diagnosis and therapeutics (e.g. specific attaching to cancer cells allowing imaging and photothermal therapy) [24,25]. AuNPs also offer biocompatibility, low cytotoxicity, high surface to volume ratio, and (opto)electronic properties [26].

Antimicrobial peptides (AMP) have emerged as an excellent alternative to antibiotics resistance [27]. AMPs are available in terrestrial and marine animals, as well as insects, plants and microorganisms [28]. Clavanin A (ClavA) is an antimicrobial peptide isolated from marine tunicate *Styela clava*. ClavA has a molecular structure rich in glycine, histidine and phenylalanine residues (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-NH₂) [29]. In addition, ClavA has been used to the development of nanostructured platforms with excellent detection for microorganisms [30].

In the present work, we developed a sensitive nanostructured platform based on ClavA-modified AuNPs over Cys self-assembled monolayers (SAM). The schematic representation of the fabrication procedure of the biosensor is shown in Fig. 1. The proposed biosensor exhibited low-detection limit (10^1 CFU.mL⁻¹) using small sample volumes. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) are highly sensitive electrochemical techniques applied to microorganism detection [31].

Electrochemical techniques and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the biosensor before and after bacteria detection.

2. Experimental

2.1. Materials

L-Cysteine (Cys), 4-mercaptobenzoic acid (MBA), chloroauric acid (HAuCl_4), sodium citrate, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) and potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) were obtained from VETEC (Brazil). Standard methods of bacteria inoculation were used in this study. All materials have been previously sterilized. Bacteria were grown in Mueller-Hinton medium for 24 h at 37 °C. All chemicals were used as received, without further purification. Ultrapure water used in all experiments was obtained from a purification system Milli-Q plus (Billerica, USA).

2.2. Synthesis of modified gold nanoparticles

AuNPs were prepared by the citrate reduction method [32]. Initially, 1 mL of HAuCl_4 was added to 99 mL of ultrapure water into a 500 mL two-neck round bottom flask. It was followed by the addition of 1% sodium citrate ($v = 4$ mL) and submitted to magnetic stirring at 60°C for 35 min, until the solution reaches a purple/violet like color. Subsequently, AuNPs solution was diluted in ultrapure water 1:4 (v/v) and 0.2 mL of 10^{-3} M MBA was added followed by magnetic stirring for 2h ($25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Finally, the previous solution changes its color to a transparent light-blue color.

2.3. Clavanin A synthesis

Clavanin A was synthesized through solid phase N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) strategy acquiring significant 95 % purity after high-performance liquid chromatography.

2.4. Preparation of the sensor system

The bare gold electrode (BGE, $\phi = 2$ mm) was polished with Al_2O_3 paste, following several washing steps with ultrapure water and NaClO bath for 2 min. Thereafter, 2 μL of Cys solution (30 mM) was adsorbed on the electrode surface by drop coating and air dried. Subsequently, EDC:NHS coupling reaction was used to activate Cys amine group [33]. The reaction was performed using an aqueous solution of 0.4 M EDC and 0.1 M NHS (1:1, v/v). The modified electrode was immersed in the previous solution for 2 min. Afterwards, 2 μL of AuNPs-MBA solution was dropped onto the Cys-modified electrode for 4 min, followed by immersion in the EDC:NHS solution to activate the carboxylic groups of the MBA molecules. Finally, 2 μL of a ClavA solution (0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was dropped on the modified electrode and air dried. The stepwise process of the biosensor assembly is shown in Fig. 1.

2.5. Recognition experiments

The recognition experiments were performed using 2 μL of bacterial solutions ranging from 10^1 to 10^7 CFU. mL^{-1} . *Escherichia coli* ATCC 25222, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were tested.

2.6. Materials characterization

Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, England) was used to determine particle size and Zeta potential of the colloidal particles. Optical absorption was evaluated through spectrophotometer Labomed UVS-2700 UV-Vis double beam (Labomed Inc., EUA) using a quartz cuvette. The experiments were carried out at room temperature (25°C). The electrochemical measurements were carried out by using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Ecochemie, Netherlands) interfaced with NOVA 1.8 software. All experiments were performed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1) used as a redox probe. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were carried out in a conventional three electrodes system. BGE, platinum wire and Ag/AgCl were used as working electrode, counter-electrode and reference, respectively. The impedance spectra were recorded in the frequency range of 100 mHz to 100 kHz using a sine wave potential of 10 mV amplitude. CV measurements were performed at a scan rate of 50 mV.s⁻¹ in the potential range from -0.2 to 0.7 V. All measurements were performed in triplicate at 25°C and inside a Faraday cage. Topographical analysis were carried out using a commercial SPM-9700 atomic force microscopy (AFM) (Shimadzu Corporation, Japan). Cantilevers with a silicon probe (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 300 kHz, spring constant = 42 N.m⁻¹) were used in a noncontact mode AFM in air (T = 25°C ± 1°C).

3. Results and Discussion

3.1. Optical and Topographical Characterizations

UV-Vis spectra of AuNPs and AuNPs-MBA show an absorption band at $\lambda = 525$ nm corresponding to colloidal gold surface plasmon resonance [34]. A bathochromic shift

was observed after chemical modification of the AuNPs, indicating metal nanoparticles aggregation. In addition, a color modification was observed from red-wine to blue due to aggregation of the AuNPs.

AFM images of the biosensor before and after interactions with bacteria strains are shown in Fig. 2. A well-distributed Cys self-assembled monolayer on the BGE surface with uniform distribution was observed in Fig. 2a. Amino acids are widely applied to biofunctionalization of gold surfaces [13]. The obtained height of 14.6 nm confirmed SAM formation. A similar result was reported by Huayhuas-Chipana et al. [35]. AuNPs-MBA adsorption resulted in an increased roughness of the system with a height of 42.7 nm (Fig. 2b). An increase in the height (44.9 nm) occurred after ClavA immobilization (Fig. 2c). Other authors reported similar results [36].

A noticeable increase in the height and roughness was observed for all studied bacteria (Fig. 2d-i). The surface topography changed after bacteria interaction, suggesting a selective recognition. *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* recognition result in heights about 518.1 nm, 370.7 nm and 320.5 nm, respectively (Fig. 2d-f). On the other hand, Gram-positive bacteria recognition results in lower heights (Fig. 2g-i).

3.2. Electrochemical characterization of the sensor platform

The adsorption time study was performed at different concentrations of Cys, AuNPs-MBA and ClavA. Based on a previous work [37], we used 30mM of Cys to obtain the best electrochemical response. Distinct adsorption times were evaluated (1, 2, 3, 4 and 5 min), using as parameter the charge transfer resistance (R_{ct}). Cys-modified electrode showed that R_{ct} vary proportional to the adsorption time (Fig. S1a). The highest R_{ct} (1.65 $K\Omega$) was obtained at 3 min, corresponding to the best coverage of the gold electrode surface. AuNPs-MBA (Fig. S1b) and ClavA (Fig. S1c) result in increasing R_{ct} values

until reach a plateau. The best adsorption time was found to be 4 min for AuNPs-MBA ($2.0\text{ K}\Omega$) and ClavA ($1.64\text{ K}\Omega$).

Fig. S2 shows the voltammetric and impedimetric responses of the electrode surface modification. The redox probe shows a reversible cyclic voltammogram with defined cathodic and anodic peaks (Fig. S2a). A decrease in the peak current response was obtained after electrode modification. Cys covalently bonds to gold surface through its thiol group to obtain the self-assembled monolayer [38]. In addition, Cys amine group reacts with NHS ester resulting in stable amide bond [39]. Cyclic voltammogram reveals an increase in the peak current response due to positive/neutral charge of the NHS ester [40]. EDC:NHS approach enables the linkage between Cys amine terminal group and carboxylic group of the MBA, resulting in a decrease of the peak current. The aromatic ring of the MBA improved the electron charge transfer resulting in additional decrease of the peak current [41]. Cys-AuNPs-MBA modified electrode was conjugated to ClavA peptide using EDC:NHS solution, which generated intermediate active ester and subsequently an amide bond [42]. CV results demonstrated a quasi-reversible behavior with an increase in the anodic and cathodic peaks current.

EIS provides additional information about the modification of the electrode surface based on the measurement of the R_{ct} . Therefore, changes on the electrode surface can be detected and evaluated by R_{ct} and capacitance [43]. Thus, R_{ct} represents the diameter of the Cole-Cole semicircle. In addition, R_{ct} is associated to the electron transfer kinetics of the redox probe in the electrode interface [44].

Nyquist diagrams of the electrode surface modification were recorded in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz (Fig. S2b). A small semicircle can be visualized for BGE ($R_{ct} = 252\ \Omega$). The addition of Cys results in an increase in the electron transfer resistance ($R_{ct} = 1.11\text{ K}\Omega$), associated to the shielding effect on the electrode

surface. As expected, a further R_{ct} increase was obtained after immobilization of AuNPs-MBA. A new decrease in the R_{ct} values was obtained after addition of the EDC:NHS solution. Conversely, an increase of the R_{ct} occurred during ClavA immobilization ($R_{ct} = 1.62 \text{ K}\Omega$).

3.4. Bacterial detection

Figure 3 shows the impedimetric response of the biosensor against different bacteria concentration (10^1 - 10^7 CFU.mL^{-1}). The voltammetric results are shown in Fig. S3. The impedimetric response of the sensor proportionally increase with the bacteria concentration as seen in Table S1.

The bacterial surface coverage (θ) was used as additional parameter to evaluate capability of the biosensor to recognize bacteria, as follow:

$$\theta = \frac{1 - R_{biosensor}}{R_{bacteria}}$$

where $R_{biosensor}$ corresponds to charge transfer resistance of the biosensor and $R_{bacteria}$ represents the charge transfer resistance obtained for the recognition of different bacteria concentrations. Fig. S4 shows a plot of θ as function of bacteria concentration (10^1 - 10^7 CFU.mL^{-1}). Our results reveal that θ values decreases with the increasing of bacteria cells concentration and at 10^1 CFU.mL^{-1} is found to be ~ 0.68 (68%) to E. coli.

The impedimetric response was evaluated using Randles circuit (Fig. 4). The proposed equivalent circuit is composed by an electrolyte solution resistance (R_{Ω}), electric double layer capacitance (C_{dl}), charge transfer resistance (R_{ct}) and Warburg element (W) [45]. The performance of the sensor was evaluated according to the equation:

$$\Delta R_{ct}(\%) = \frac{R_{ct(bac)} - R_{ct(sensor)}}{R_{ct(sensor)}} \times 100$$

where $R_{ct}(\text{sensor})$ corresponds to the value of charge transfer resistance of the Cys_AuNPs-MBA_ClavA modified electrode before exposure to bacteria. $R_{ct}(\text{bac})$ is the value of charge transfer resistance after exposure to bacterial solutions. A summary of these results is given in Table S1.

The biosensor was tested against Gram-negative (*E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. typhimurium*) and Gram-positive (*E. faecalis*, *B. subtilis* and *S. aureus*) bacteria varying the concentration from 10^1 to 10^7 CFU.mL⁻¹. An analytical comparison of different biosensors can be visualized in Table 1. As seen in Fig. 5, ΔR_{ct} values increase as follow: *B. subtilis* < *S. aureus* < *E. faecalis* < *S. typhimurium* < *K. pneumoniae* < *E. coli*. As explained, lower impedimetric responses were observed for Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative bacteria, reflecting the ability of the ClavA to distinguish between bacteria [30]. The bacterial cell wall structure is composed of different layers of peptidoglycan. The cell wall of Gram-positive bacteria consists of a thin positively charged layer. Conversely, Gram-negative bacteria possess a lipopolysaccharide outer membrane responsible for negatively charged surface that contribute to ClavA interaction [46].

4. Conclusions

In the present paper an electrochemical biosensor for detection of Gram-negative and Gram-positive bacteria was developed. Our results demonstrate the effectiveness of the biosensor in detecting and differentiating bacteria strains using ClavA peptide. ClavA showed a better detection for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. typhimurium*. The difference in response is due to the cellular wall that is composed by a thin inner peptidoglycan layer make its surface more negatively charged, favoring a better electrostatic interaction with positive charged ClavA. The limit detection was about 10^1 CFU.mL⁻¹ corresponding to ~

0.01 bacterium. μL^{-1} . ClavA-based biosensor platform can be considered an efficient alternative to detection of pathogenic bacteria as compared to conventional techniques.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the support provided by the CNPq and INCT. Andrade and Oliveira are also gratefully for CNPq financial support (grant 302885/2015-3 and 302930/2015-9, respectively). da Silva Junior would like to thank FACEPE for MSc scholarship.

References

- [1] J. Fernández-Gracia, J.-P. Onnela, M.L. Barnett, V.M. Eguíluz, N.A. Christakis, Influence of a patient transfer network of US inpatient facilities on the incidence of nosocomial infections., *Sci. Rep.* 7 (2017) 2930. doi:10.1038/s41598-017-02245-7.
- [2] (Who) World Health Organization, Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide., *WHO Libr. Cat. Data.* (2011) 40. doi:http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501507_eng.pdf.
- [3] S. Sirijan, I. Nitaya, Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria in ESKAPE pathogens, *Control.* 2016 (2006). doi:10.1016/j.ajic.2006.05.219.
- [4] W. Bereket, K. Hemalatha, B. Getenet, T. Wondwossen, A. Solomon, A. Zeynudin, S. Kannan, Update on bacterial nosocomial infections, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 16 (2012) 1039–1044.
- [5] H.A. Khan, A. Ahmad, R. Mehboob, Nosocomial infections and their control strategies, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5 (2015) 509–514. doi:10.1016/j.apjtb.2015.05.001.
- [6] G. Vernet, C. Mary, D.M. Altmann, O. Doumbo, S. Morpeth, Z.A. Bhutta, K.P. Klugman, Surveillance for antimicrobial drug resistance in under-resourced countries, *Emerg. Infect. Dis.* 20 (2014) 434–441. doi:10.3201/eid2003.121157.
- [7] X.Z. Li, P. Plésiat, H. Nikaido, The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria, *Clin. Microbiol. Rev.* 28 (2015) 337–418. doi:10.1128/CMR.00117-14.
- [8] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 232–254. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.

- [9] M.M. López, P. Llop, A. Olmos, E. Marco-Noales, M. Cambra, E. Bertolini, Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?, *Curr. Issues Mol. Biol.* 11 (2009) 13–46.
- [10] R.A.S. Luz, R.M. Iost, F.N. Crespilho, Nanomaterials for Biosensors and Implantable Biodevices, in: *Nanobioelectrochemistry From Implant. Biosens. to Green Power Gener.*, 2013: pp. 1–137. doi:10.1007/978-3-642-29250-7.
- [11] V. Perumal, U. Hashim, Advances in biosensors: Principle, architecture and applications, *J. Appl. Biomed.* 12 (2014) 1–15. doi:10.1016/j.jab.2013.02.001.
- [12] T. Arakawa, K. Tsumoto, Y. Kita, B. Chang, D. Ejima, Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations, *Amino Acids.* 33 (2007) 587–605. doi:10.1007/s00726-007-0506-3.
- [13] N.F. Atta, A. Galal, E.H. El-Ads, A novel sensor of cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles for the selective determination of epinephrine in presence of sodium dodecyl sulfate., *Analyst.* 137 (2012) 2658–68. doi:10.1039/c2an16210e.
- [14] S. Mukdasai, V. Langsi, M. Pravda, S. Srijaranai, J.D. Glennon, A highly sensitive electrochemical determination of norepinephrine using L-cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes electrode in the presence of sodium dodecyl sulfate, *Sensors Actuators, B Chem.* 236 (2016) 126–135. doi:10.1016/j.snb.2016.05.086.
- [15] Y. Li, H. Schluesener, S. Xu, Gold nanoparticle-based biosensors, *Gold Bull.* 43 (2010) 29–41. doi:10.1007/s00216-005-3221-5.
- [16] W. Li, X. Zhao, B. Du, X. Li, S. Liu, X.-Y. Yang, H. Ding, W. Yang, F. Pan, X. Wu, L. Qin, Y. Pan, Gold Nanoparticle-Mediated Targeted Delivery of Recombinant Human Endostatin Normalizes Tumour Vasculature and Improves Cancer Therapy, *Sci. Rep.* 6 (2016) 30619. doi:10.1038/srep30619.
- [17] S.Y. Oh, N.S. Heo, S. Shukla, H.-J. Cho, A.T.E. Vilian, J. Kim, S.Y. Lee, Y.-K. Han, S.M. Yoo, Y.S. Huh, Development of gold nanoparticle-aptamer-based LSPR sensing chips for the rapid detection of *Salmonella typhimurium* in pork meat, *Sci. Rep.* 7 (2017) 10130. doi:10.1038/s41598-017-10188-2.
- [18] A.K. Rengan, A.B. Bukhari, A. Pradhan, R. Malhotra, R. Banerjee, R. Srivastava, A. De, In vivo analysis of biodegradable liposome gold nanoparticles as efficient agents for photothermal therapy of cancer, *Nano Lett.* 15 (2015) 842–848. doi:10.1021/nl5045378.
- [19] M.-K. Chuang, S.-W. Lin, F.-C. Chen, C.-W. Chu, C.-S. Hsu, Gold nanoparticle-decorated graphene oxides for plasmonic-enhanced polymer photovoltaic devices., *Nanoscale.* 6 (2014) 1573–9. doi:10.1039/c3nr05077g.
- [20] P. Zhang, Z.A. Qiao, X. Jiang, G.M. Veith, S. Dai, Nanoporous ionic organic networks: Stabilizing and supporting gold nanoparticles for catalysis, *Nano Lett.* 15 (2015) 823–828. doi:10.1021/nl504780j.
- [21] S. Hamza, A. Ignaszak, A. Kiani, Synthesis of Electrical Conductive Silica Nanofiber/Gold Nanoparticle Composite by Laser Pulses and Sputtering Technique,

Nanoscale Res. Lett. 12 (2017). doi:10.1186/s11671-017-2200-z.

[22] N. Atar, T. Eren, M.L. Yola, Ultrahigh capacity anode material for lithium ion battery based on rod gold nanoparticles decorated reduced graphene oxide, *Thin Solid Films*. 590 (2015) 156–162. doi:10.1016/j.tsf.2015.07.075.

[23] H. Schlicke, C.J. Schröter, T. Vossmeier, Electrostatically driven drumhead resonators based on freestanding membranes of cross-linked gold nanoparticles, *Nanoscale*. 8 (2016) 183–186. doi:10.1039/C6NR02654K.

[24] J.R. Melamed, R.S. Riley, D.M. Valcourt, E.S. Day, Using Gold Nanoparticles to Disrupt the Tumor Microenvironment: An Emerging Therapeutic Strategy, *ACS Nano*. 10 (2016) 10631–10635. doi:10.1021/acsnano.6b07673.

[25] Y. Ishida, I. Akita, T. Sumi, M. Matsubara, T. Yonezawa, Thiolate-Protected Gold Nanoparticles Via Physical Approach: Unusual Structural and Photophysical Characteristics, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29928. doi:10.1038/srep29928.

[26] S. Nicolardi, Y.E.M. van der Burgt, J.D.C. Codée, M. Wuhler, C.H. Hokke, F. Chiodo, Structural Characterization of Biofunctionalized Gold Nanoparticles by Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry, *ACS Nano*. (2017) acsnano.7b03402. doi:10.1021/acsnano.7b03402.

[27] M. Hassan, M. Kjos, I.F. Nes, D.B. Diep, F. Lotfipour, Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance, *J. Appl. Microbiol.* 113 (2012) 723–736. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x.

[28] B. Bechinger, S.U. Gorr, Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance, *Methods Mol. Biol.* 618 (2016) 235–247. doi:10.1007/978-1-60761-594-1.

[29] J. Cruz, C. Ortiz, F. Guzmán, R. Fernández-Lafuente, R. Torres, Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms., *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 2299–321. doi:10.2174/0929867321666140217110155.

[30] C.A.S. Andrade, J.M. Nascimento, I.S. Oliveira, C.V.J. de Oliveira, C.P. de Melo, O.L. Franco, M.D.L. Oliveira, Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. (2015). doi:10.1016/j.colsurfb.2015.03.037.

[31] F. Scholz, Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications, in: U. Retter, H. Lohse (Eds.), *Electroanal. Methods Guid. to Exp. Appl.*, Springer Berlin Heidelberg, 2010: pp. 159–177. doi:10.1007/978-3-642-02915-8.

[32] G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci.* 241 (1973) 20–22. doi:10.1038/physci241020a0.

[33] M.J. Cannon, D.G. Myszka, Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach, 126 (2002) 79–92. doi:10.1007/978-1-60327-567-5_5.

[34] C.J. Murphy, A.M. Gole, J.W. Stone, P.N. Sisco, A.M. Alkilany, E.C. Goldsmith, S.C. Baxter, Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008). doi:10.1021/ar800035u.

- [35] B.C. Huayhuas-Chipana, J.C.M. Gomero, M.D.P.T. Sotomayor, Nanostructured screen-printed electrodes modified with self-assembled monolayers for determination of metronidazole in different matrices, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 1737–1745. doi:10.5935/0103-5053.20140170.
- [36] M.R. Knecht, T.R. Walsh, *Bio-Inspired Nanotechnology: From Surface Analysis to Applications*, Springer Science & Business Media, 2014.
- [37] D.M.N. Luna, K.Y.P.S. Avelino, M.T. Cordeiro, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers, *Sensors Actuators B Chem.* 220 (2015) 565–572. doi:10.1016/j.snb.2015.05.067.
- [38] H. Häkkinen, The gold–sulfur interface at the nanoscale, *Nat. Chem.* 4 (2012) 443–455. doi:10.1038/nchem.1352.
- [39] D. Samanta, A. Sarkar, Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications., *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 2567–2592. doi:10.1039/c0cs00056f.
- [40] P. Geng, X. Zhang, W. Meng, Q. Wang, W. Zhang, L. Jin, Z. Feng, Z. Wu, Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of *Escherichia coli* using electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochim. Acta.* 53 (2008) 4663–4668. doi:10.1016/j.electacta.2008.01.037.
- [41] H. Wang, H. Ohnuki, H. Endo, M. Izumi, Preparation of amperometric glucose biosensor based on 4-mercaptobenzoic acid, *Phys. Procedia.* 14 (2011) 2–6. doi:10.1016/j.phpro.2011.05.003.
- [42] L.G. Carrascosa, M. Moreno, M. Álvarez, L.M. Lechuga, Nanomechanical biosensors: A new sensing tool, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 196–206. doi:10.1016/j.trac.2005.09.006.
- [43] F. Lisdat, D. Schäfer, The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1555–1567. doi:10.1007/s00216-008-1970-7.
- [44] H. Razmi, R. Mohammad-Rezaei, Graphene quantum dots as a new substrate for immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase: Application to sensitive glucose determination, *Biosens. Bioelectron.* 41 (2013) 498–504. doi:10.1016/j.bios.2012.09.009.
- [45] F. Scholz, *Electroanalytical Methods*, Berlin-Heidelberg: Springer, 2010. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [46] J.S. Dickson, M. Koohmaraie, R.L. Hruska, Cell Surface Charge Characteristics and Their Relationship to Bacterial Attachment to Meat Surfaces, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 832–836.
- [47] Y. Chen, Z.P. Michael, G.P. Kotchey, Y. Zhao, A. Star, Electronic detection of bacteria using holey reduced graphene oxide., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 3805–10. doi:10.1021/am500364f.
- [48] M.-S. Chang, J.H. Yoo, D.H. Woo, M.-S. Chun, Efficient detection of *Escherichia*

coli O157:H7 using a reusable microfluidic chip embedded with antimicrobial peptide-labeled beads., *Analyst*. 140 (2015) 7997–8006. doi:10.1039/c5an01307k.

[49] N. V. Kulagina, M.E. Lassman, F.S. Ligler, C.R. Taitt, Antimicrobial peptides for detection of bacteria in biosensor assays, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6504–6508. doi:10.1021/ac050639r.

[50] P.B. Lillehoj, C.W. Kaplan, J. He, W. Shi, C.-M. Ho, Rapid, Electrical Impedance Detection of Bacterial Pathogens Using Immobilized Antimicrobial Peptides, *J. Lab. Autom.* 19 (2013) 42–49. doi:10.1177/2211068213495207.

[51] H. Etayash, K. Jiang, T. Thundat, K. Kaur, Impedimetric detection of pathogenic gram-positive bacteria using an antimicrobial peptide from class IIa bacteriocins, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1693–1700. doi:10.1021/ac4034938.

[52] O. Schwartz, M. Bercovici, Microfluidic assay for continuous bacteria detection using antimicrobial peptides and isotachopheresis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10106–10113. doi:10.1021/ac5017776.

[53] K. Jiang, H. Etayash, S. Azmi, S. Naicker, M. Hassanpourfard, P.M. Shaibani, G. Thakur, K. Kaur, T. Thundat, Rapid label-free detection of *E. coli* using antimicrobial peptide assisted impedance spectroscopy, *Anal. Methods*. 7 (2015) 9744–9748. doi:10.1039/C5AY01917F.

[54] E. Tenenbaum, E. Segal, Optical biosensors for bacteria detection by a peptidomimetic antimicrobial compound., *Analyst*. 140 (2015) 7726–33. doi:10.1039/c5an01717c.

Table captions

Table 1. Analytical comparison between different biosensors platforms.

AMPs	Target bacteria	Detection limit (CFU.mL ⁻¹)	Technique	Reference
Magainin I	<i>Listeria sp.</i> <i>Escherichia coli</i>	10 ⁴	Field-effect-transistor	[47]
Magainin I	<i>Escherichia coli</i>	10 ³	Fluorescence	[48]
Magainin I	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Escherichia coli</i>	10 ⁷	Fluorescence	[49]
Clavanin A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	10 ²	Electrochemical impedance	[30]
C16G2cys	<i>Streptococcus mutans</i>	10 ⁴	Electrochemical impedance	[50]
G10KHc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 ⁴	Electrochemical impedance	[50]
Leucocin A	<i>Listeria monocitogenes</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	10 ³	Electrochemical impedance	[51]
Indolicidin	<i>Escherichia coli</i>	10 ⁸	Fluorescence	[52]
Colicin V	<i>Escherichia coli</i>	10 ²	Electrochemical impedance	[53]
K-7α12	<i>Listeria innocua</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Escherichia coli</i>	10 ³	Spectrometry	[54]

Figure captions

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

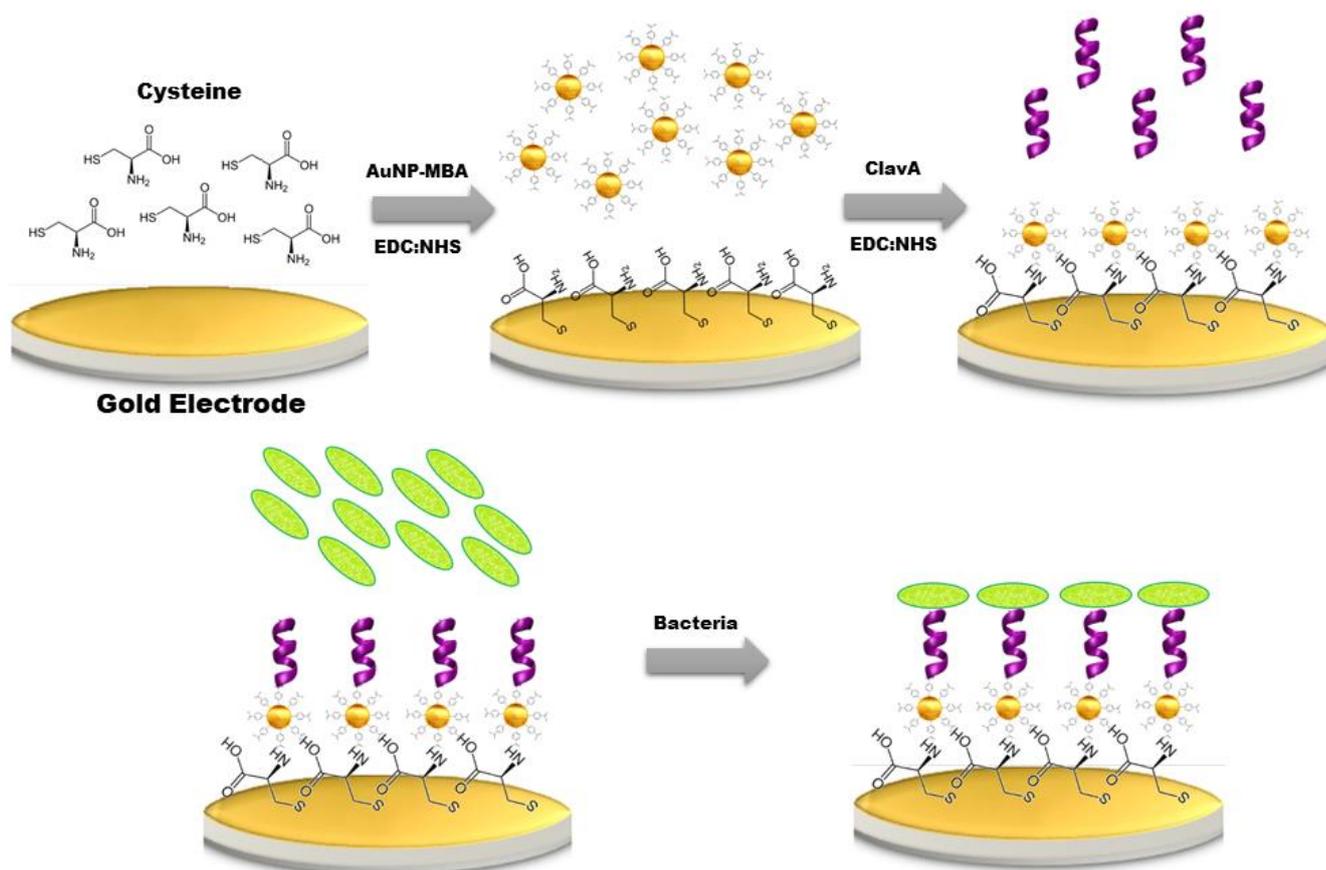


Fig. 2. AFM topographic images of the Cys monolayer (a), Cys_AuNPs-MBA (b), Cys_AuNPs-MBA_ClavA (c), Cys_AuNPs-MBA_ClavA-*E. coli* (d), Cys_AuNPs-MBA_ClavA-*K. pneumoniae* (e), Cys_AuNPs-MBA_ClavA-*S. typhimurium* (f), Cys_AuNPs-MBA_ClavA-*E. faecalis* (g), Cys_AuNPs-MBA_ClavA-*B. subtilis* (h) and Cys_AuNPs-MBA_ClavA-*S. aureus* (i).

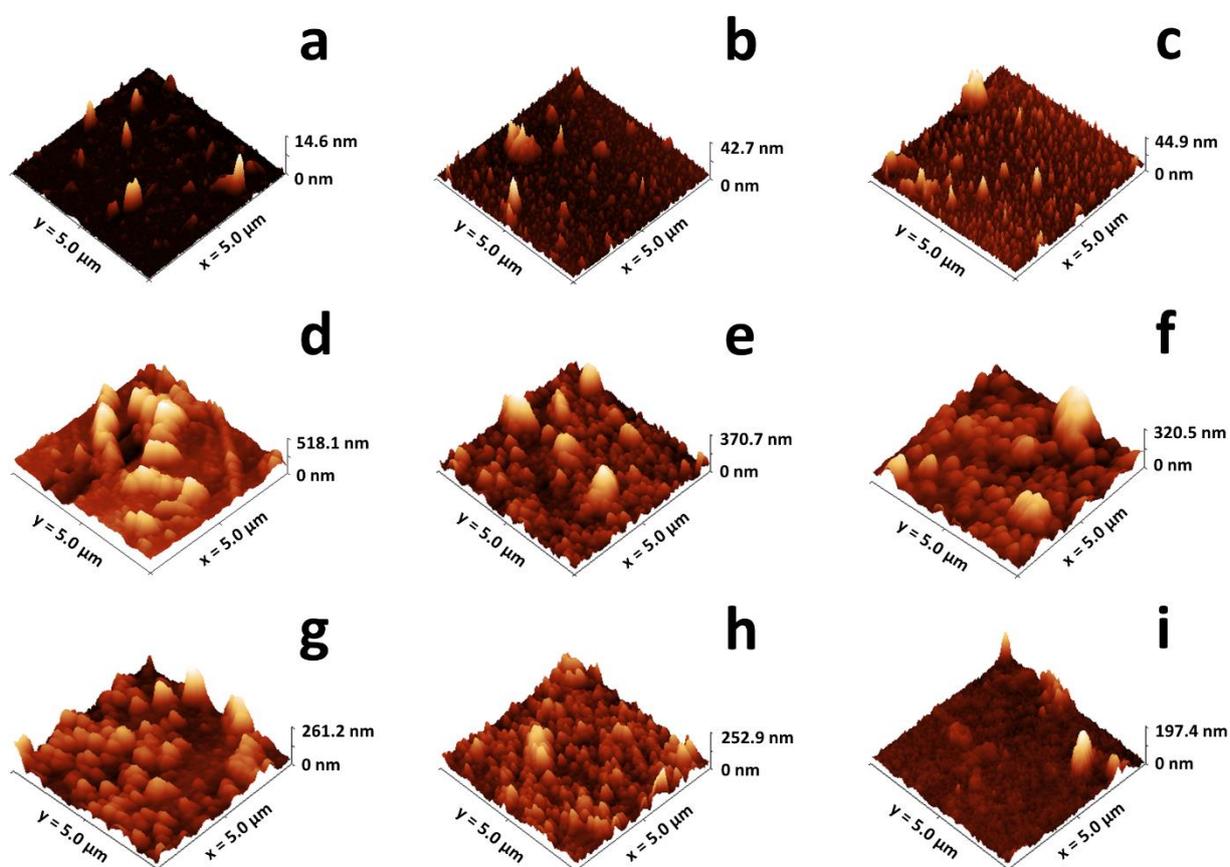


Fig. 3. Nyquist plots of the sensor system for bacteria strains at different concentrations: *E. coli* (a), *E. faecalis* (b), *K. pneumoniae* (c), *B. subtilis* (d), *S. typhimurium* (e) and *S. aureus* (f).

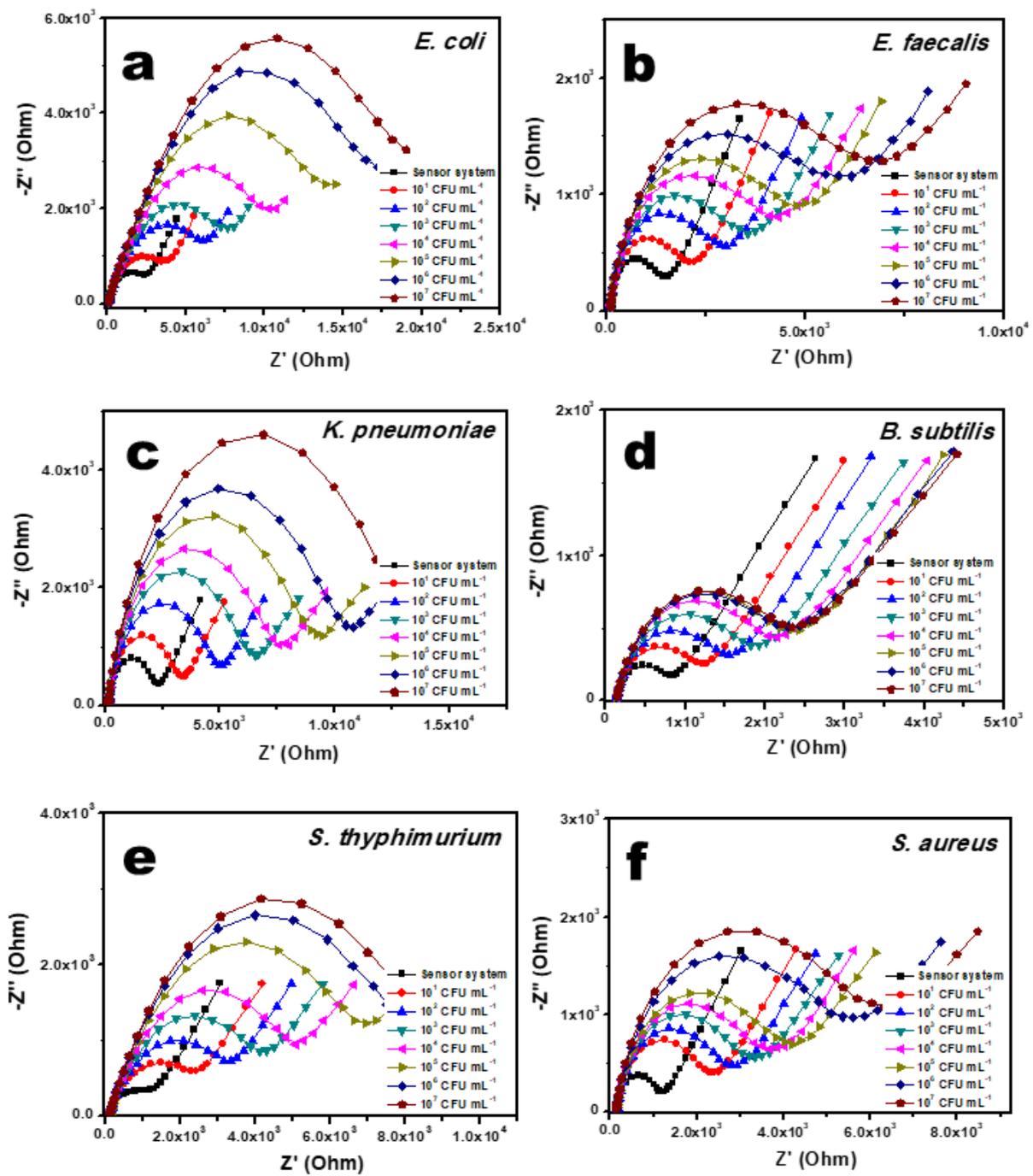


Fig. 4. Equivalent circuit used for fitting the experimental results, where R_{Ω} represents the ohmic resistance of the electrolyte solution, Q is the phase constant element, Z_w is the Warburg impedance and R_{ct} is the charge transfer resistance.

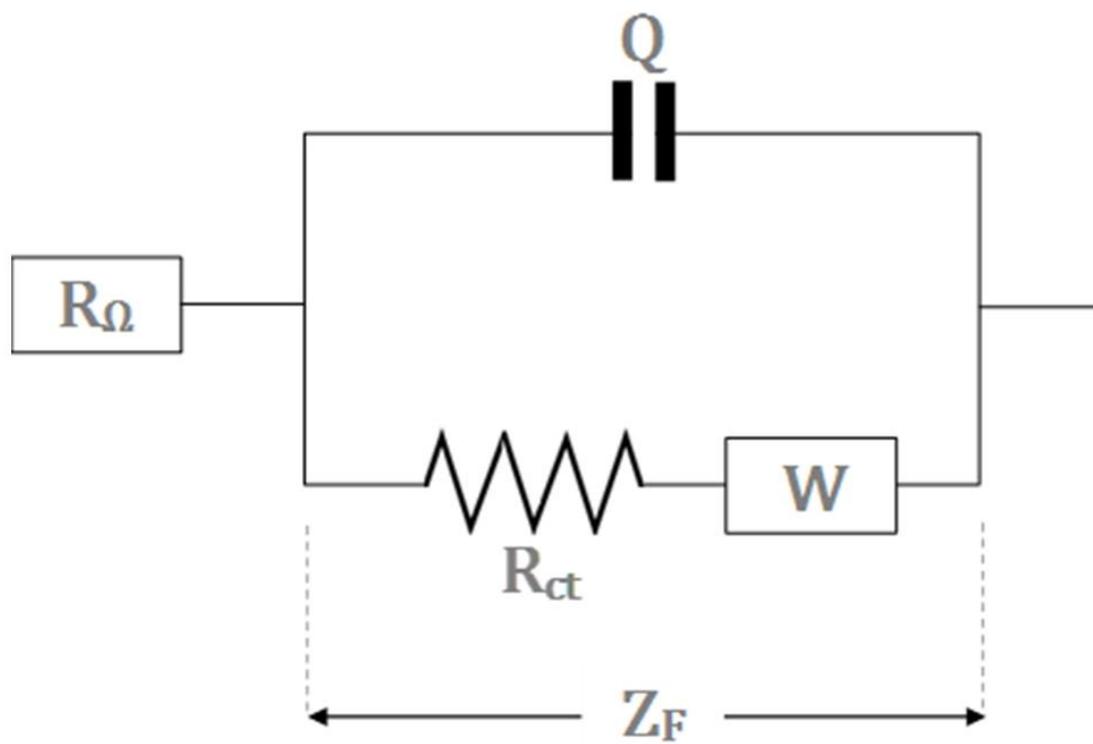


Fig. 5. ΔR_{ct} of the sensor system after exposure to different concentrations of Gram-negative (a) and Gram-positive bacteria (b).

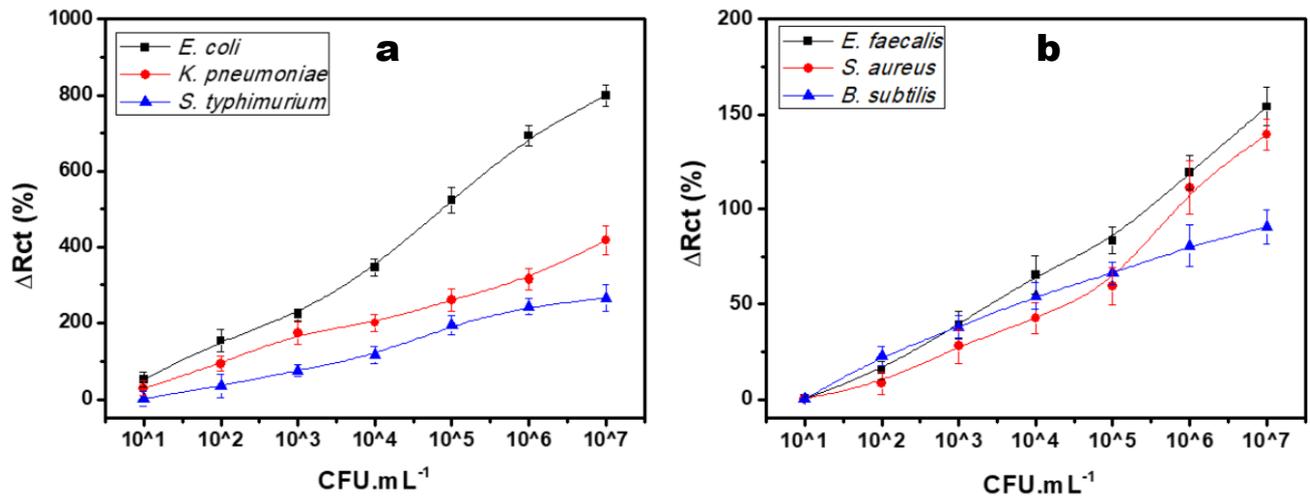


Figure S1. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) of the electrode modification process: bare gold electrode (■), Cys (●), EDC:NHS (▲), AuNPs-MBA (◆), second EDC:NHS application (▼), ClavA (*).

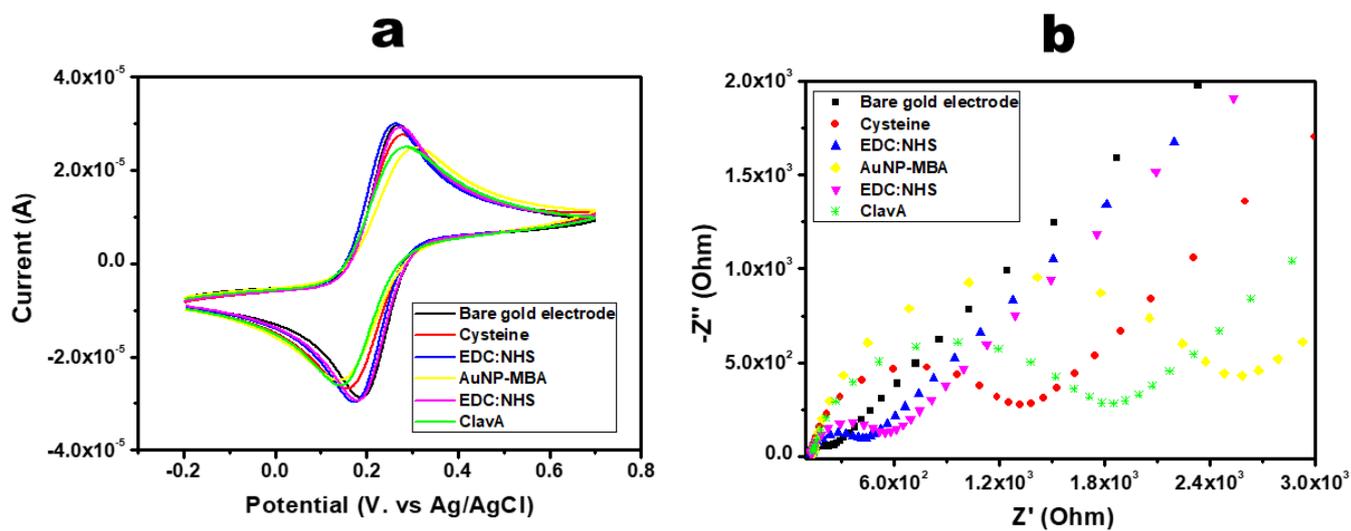


Figure S2. Cyclic voltammograms of the biosensor versus bacteria strains at different concentrations: *E. coli* (a), *K. pneumoniae* (b), *S. typhimurium* (c), *E. faecalis* (d), *B. subtilis* (e) and *S. aureus* (f). Supporting electrolyte: 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) in PBS (pH 7.2) solution; scan rate 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

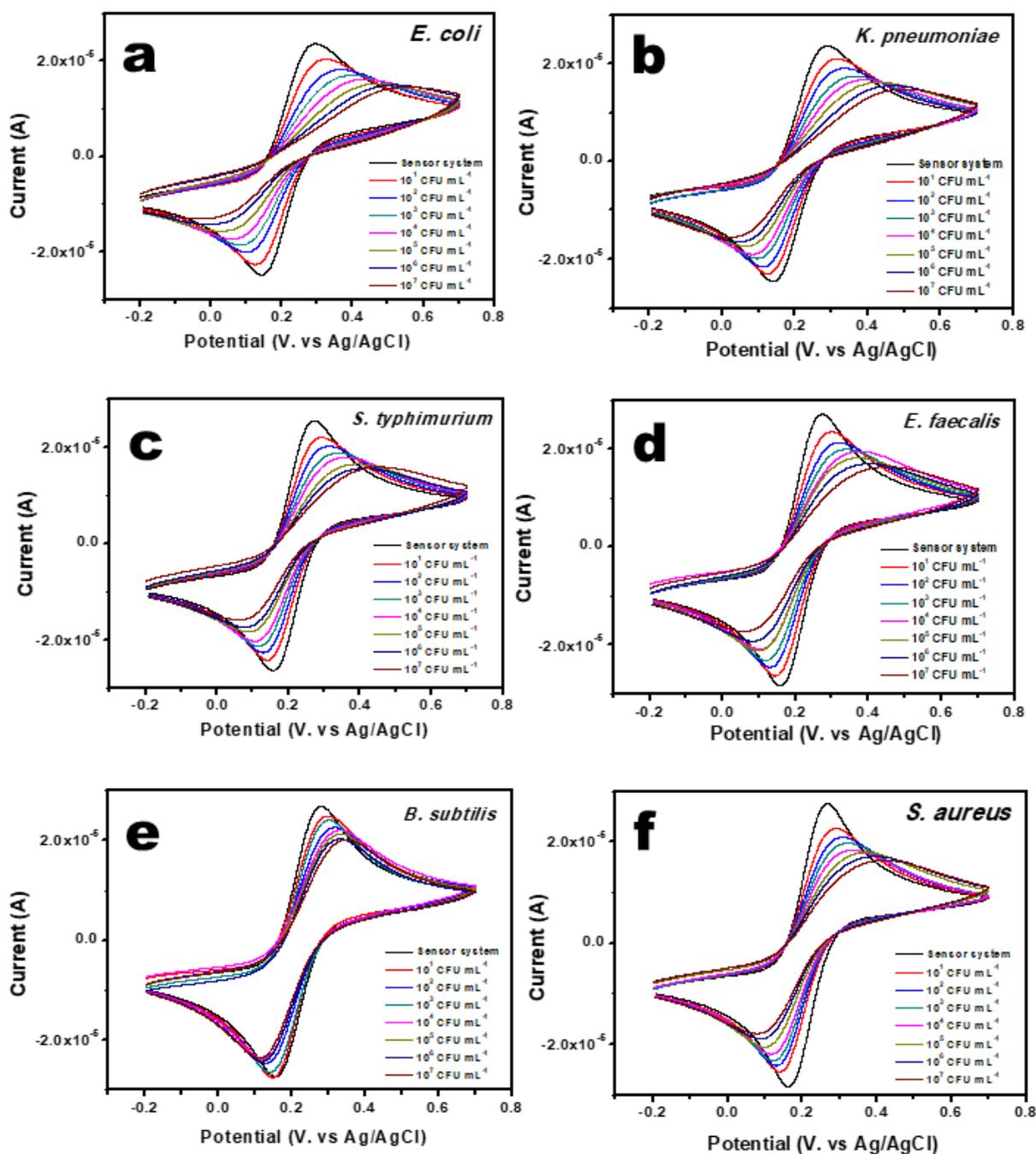


Figure S3. Bacterial surface coverage (θ) values as a function of the bacterial concentration (10^1 - 10^7 CFU mL⁻¹). All data used to calculate θ values are shown in Table S1.

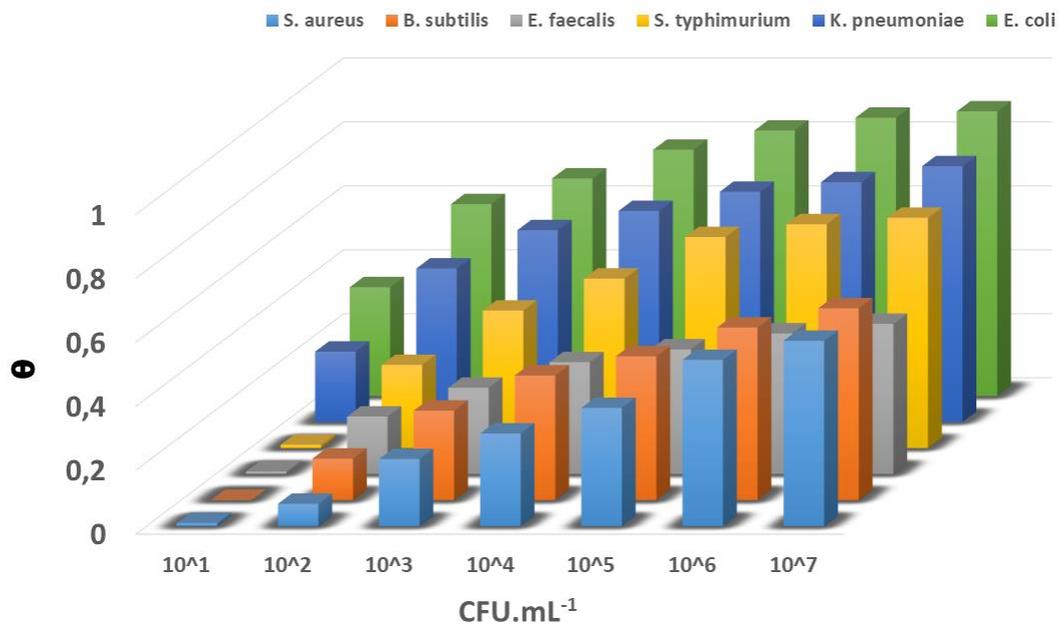


Table S1. Values of the equivalent circuit elements from the fitted impedance results.

Concentration (CFU.mL ⁻¹)	R _{ct} (kΩ)	Q (μF)	n	θ
<i>E. coli</i>				
10 ¹	3.6	9.92	0.62	0.34
10 ²	6.03	10.8	0.604	0.6
10 ³	7.64	11.2	0.601	0.68
10 ⁴	10.6	11.6	0.592	0.77
10 ⁵	14.8	11.7	0.59	0.83
10 ⁶	18.8	11.8	0.586	0.87
10 ⁷	21.3	11.6	0.586	0.89
<i>K. pneumoniae</i>				
10 ¹	3.05	1.24	0.843	0.22
10 ²	4.59	1.36	0.83	0.48
10 ³	6.05	1.33	0.828	0.6
10 ⁴	7.12	1.32	0.829	0.66
10 ⁵	8.58	1.32	0.83	0.72
10 ⁶	9.86	1.33	0.829	0.75
10 ⁷	12.3	1.34	0.828	0.8
<i>S. typhimurium</i>				
10 ¹	2.4	9.5	0.667	0.01
10 ²	3.21	8.77	0.675	0.26
10 ³	4.16	8.11	0.685	0.43
10 ⁴	5.11	7.49	0.693	0.53
10 ⁵	7.01	6.91	0.697	0.66
10 ⁶	8.14	6.56	0.7	0.7
10 ⁷	8.69	6.24	0.706	0.72
<i>B. subtilis</i>				
10 ¹	2.35	1.4	0.872	0.001
10 ²	2.91	1.42	0.872	0.13
10 ³	3.27	1.41	0.872	0.28
10 ⁴	3.66	1.41	0.872	0.39
10 ⁵	3.94	1.24	0.882	0.45
10 ⁶	4.28	1.17	0.883	0.54
10 ⁷	4.52	1.13	0.877	0.6
<i>E. faecalis</i>				
10 ¹	2	2.05	0.749	0.008
10 ²	2.73	2.03	0.745	0.18
10 ³	3.3	2.17	0.737	0.27
10 ⁴	3.92	2.18	0.734	0.35
10 ⁵	4.35	2.2	0.74	0.39
10 ⁶	5.2	2.25	0.723	0.44
10 ⁷	6.02	2.22	0.723	0.47

<i>S. aureus</i>				
10^1	2.15	1.59	0.785	0.01
10^2	2.57	1.68	0.777	0.07
10^3	3.03	1.68	0.776	0.21
10^4	3.38	1.68	0.774	0.29
10^5	3.78	1.76	0.77	0.37
10^6	5.01	1.82	0.776	0.52
10^7	5.67	1.58	0.777	0.58