



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

ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE BIODISPOSITIVOS A PARTIR DE MOLÉCULAS
BIOINSPIRADAS DO PANTANAL PARA APLICAÇÕES EM MICRORGANISMOS**

RECIFE

2021

ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE BIODISPOSITIVOS A PARTIR DE MOLÉCULAS
BIOINSPIRADAS DO PANTANAL PARA APLICAÇÕES EM MICRORGANISMOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade.
Coorientador: Prof. Dr. Isaac Aaron Morales Frias.

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Silva Junior, Alberto Galdino da

Desenvolvimento de biodispositivos a partir de moléculas bioinspiradas do Pantanal para aplicações em microrganismos / Alberto Galdino da Silva Junior – 2021.

270 f. : il., fig., tab.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade

Coorientador: Isaac Aaron Morales Frias

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Biotecnologia 2. Microrganismos 3. Peptídeos I. Andrade, César Augusto (orient). II. Morales Frías, Isaac Aaron (coorient.) III. Título

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-170

ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE BIODISPOSITIVOS A PARTIR DE MOLÉCULAS
BIOINSPIRADAS DO PANTANAL PARA APLICAÇÕES EM MICRORGANISMOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 23 / 06 / 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Maria Danielly Lima de Oliveira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maíra Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, à minha irmã, à minha sobrinha e aos invisíveis desse mundo,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tudo fez.

Aos meus pais Alberto e Marli e irmã Aline por todo apoio e incentivo a dar o melhor em tudo, principalmente nos estudos, apesar das dificuldades que a vida possa trazer.

A minha sobrinha Diana (*aka* aquela que vai tomar posse da minha estante de livros e da montanha de brindes do Mc Donalds e BK sem eu perceber) que veio sendo mais um motivo para sorrir.

Aos meus orientadores Prof. Dr. César Andrade e Prof. Dr. Isaac Morales, por todo conhecimento, pelo tempo doado, paciência e apoio ao longo desses anos, se tornando verdadeiros pai e irmão acadêmicos e inspiração que levarei para o resto da vida.

À Prof^a. Dr^a Maria Danielly por todo apoio na pesquisa nesses anos de laboratório.

Ao Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados (BioNano) pela companhia ao longo de quase uma década, por terem ajudado de certa forma em minha pesquisa e pela árdua tarefa de tentarem aguentar meu temperamento e personalidade inescrutável (malz pessoal, amo vocês ^^).

Ao prof. Dr. Octávio Franco e Ludovico Migliolo pelo fornecimento dos peptídeos antimicrobianos, um dos principais componentes das plataformas sensoras desenvolvidas.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves do Departamento de Micologia da UFPE e Dra. Sandra Regina pelo apoio no semeio e fornecimento dos microrganismos utilizados na pesquisa.

À CAPES pelo fomento na pesquisa e pela bolsa concedida.

A todos aqueles que não conheço e que de certa forma ajudaram de maneira paralela em alguma etapa desse trabalho.

De coração, obrigado, a todos.

RESUMO

Infecções causadas pela água contaminada por microrganismos são umas das principais causas de mortalidade em países considerados de terceiro mundo e no Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A rápida identificação se torna essencial para a aplicação da terapêutica mais apropriada. Diante dos métodos tradicionais de diagnóstico, os biossensores têm se destacado por serem dispositivos de baixo custo e elevada sensibilidade, se tornando uma opção salutar por unir tais características à nanotecnologia. Visando a detecção de microrganismos em plataformas sensoras, peptídeos antimicrobianos e lectinas demonstraram ser uma inovadora opção de elementos de biorreconhecimento. Dessa forma, o presente projeto visou o desenvolvimento de plataformas biossensores baseadas em nanopartículas magnéticas sintetizadas pelo método de co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} , o qual tiveram a superfície funcionalizada por quitosana e nanopartículas de ouro, seguido da ancoragem dos peptídeos antimicrobianos Clavanina A (ClavA), Temporina-PTA (T-PTA) e Synoeca-MP (Syno-MP), além da lectina concanavalina A (ConA), submetendo a plataforma à detecção de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras em suspensões variando de 10^1 a 10^6 unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL). A avaliação eletroquímica realizada por meio da voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) revelou que os sensores com peptídeos apresentaram maior afinidade frente a bactérias Gram-negativas, com destaque à *Klebsiella pneumoniae*, cuja interação se deu por interações via atração eletrostática seguida da inserção na parede celular. A lectina ConA indicou maior resposta eletroquímica frente espécies Gram-positivas, cuja interação se deu pela afinidade da lectina com carboidratos como a N-acetilglicosamina, D-glicose, D-manose e glicoconjugados. Tais sacarídeos estão presentes no peptidoglicano, ácido lipoteicoico e lipopolissacarídeo das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Com limite de detecção de 10^1 UFC mL apresentadas por todos os sensores desenvolvidos, eles podem se caracterizar como uma promissora opção de análise e diagnóstico laboratorial de microrganismos.

Palavras-chave: Biossensor; Eletroquímica; Microrganismos; Peptídeos antimicrobianos; Lectinas.

ABSTRACT

Infections caused by water contaminated with microorganisms are one of the main causes of mortality in third world countries and in Brazil, especially in the North and Northeast regions. Rapid identification becomes essential for the application of the most appropriate therapy. Faced with traditional diagnostic methods, biosensors have stood out for being low-cost and high-sensitivity devices, becoming an excellent option for uniting such characteristics to nanotechnology. Aiming at the detection of microorganisms in sensor platforms, antimicrobial peptides and lectins proved to be an innovative option for biorecognition elements. Thus, the present project aimed at the development of biosensor platforms based on magnetic nanoparticles synthesized by the co-precipitation method of Fe^{2+} and Fe^{3+} . It had its surface functionalized by chitosan and gold nanoparticles, followed by anchoring the antimicrobial peptides Clavanin A (ClavA), Temporin-PTA (T-PTA) and Synoeca-MP (Syno-MP), in addition to the lectin concanavalin A (ConA), subjecting the platform to the detection of Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeast in suspensions ranging from 10^1 to 10^6 colony forming units per mL (CFU mL). The electrochemical evaluation carried out using cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) revealed that sensors with peptides showed greater affinity against Gram-negative bacteria, especially *Klebsiella pneumoniae*, whose interaction was due to interactions through electrostatic attraction followed by insertion into the cell wall. The ConA lectin showed greater electrochemical response against Gram-positive species, whose interaction was due to the affinity of the lectin with carbohydrates such as N-acetylglucosamine, D-glucose, D-mannose and glycoconjugates. Such saccharides are present in the peptidoglycan, lipoteichoic acid and lipopolysaccharide of Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. With a detection limit of 10^1 CFU mL presented by all developed sensors, they can be characterized as a promising option for laboratory analysis and diagnosis of microorganisms.

Keywords: Biosensor; Electrochemistry; Microorganisms; Antimicrobial peptides; Lectins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Elementos e componentes de um típico biossensor	31
Figura 2 –	Principais componentes presentes na bancada de experimentos de biossensores	33
Figura 3 –	Configurações/organização de eletrodos usados em estudos eletroquímicos	35
Figura 4 –	Esquema do processo de transferência de elétrons no eletrodo e difusão das espécies eletroativas	35
Figura 5 –	Esquema demonstrando os componentes que dão origem a dupla camada elétrica na interface eletrodo-solução	38
Figura 6 –	Voltamograma cíclico demonstrando uma reação reversível na superfície de um eletrodo	46
Figura 7 –	Ilustração demonstrando a relação entre o potencial e a corrente. V_m e I_m : amplitude do potencial e corrente, respectivamente	50
Figura 8 –	Ilustração do vetor ou “fasor” (seta vermelha) da impedância mostrando seu componente real (Z_{real}) e imaginário (Z_{im}) (setas azuis)	51
Figura 9 –	Representação da EIS pelo diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode (b). R_s , R_{CT} , C_{DL} e Z_w são os elementos do circuito equivalente de Randles, o qual representam certas porções de cada diagrama	52
Figura 10 –	Representação do circuito equivalente de Randles e a passagem da corrente capacitiva (i_c) e faradaica (i_f)	53
Figura 11 –	Representação esquemática de um microscópio de força atômica e seus principais componentes	54
Figura 12 –	Modos de operação de um microscópio de força atômica	55
Figura 13 –	Estrutura de uma monocamada automontada	58
Figura 14 –	Etapas da produção de AuNPs pelo método de Frens e Turkevich: a) solução de $HAuCl_4$, b) adição do citrato de sódio à solução $HAuCl_4$, resultando na mudança de cor pelo processo de redução, c) AuNPs	60
Figura 15 –	Etapas da produção de Fe_3O_4 pelo método da co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} . a) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, b) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, c) síntese da	61

	Fe ₃ O ₄ , obtida após a adição da base NH ₄ OH, d) Fe ₃ O ₄ (seta vermelha) sendo “pescadas” por um imã (seta preta), e) Fe ₃ O ₄ .	
Figura 16 –	Eletrodo com superfície de ouro (a) e de carbono vítreo (b) antes e após o processo de eletropolimerização do Ppy (c), Pani (d) e eletrodeposição de ouro (e)	62
Figura 17 –	Diferentes métodos de funcionalização da superfície de nanopartículas	63
Figura 18 –	Diferentes estratégias de elementos de biorreconhecimento usados em biossensores aplicados para a detecção de microrganismos	64
Figura 19 –	Representação esquemática dos eventos moleculares da interação dos AMPs com bactérias e principais mecanismos de ação da ruptura da parede celular microbiana	66
Figura 20 –	Formas estruturais dos AMPs	67
Figura 21 –	Nome, sequência dos resíduos de aminoácidos, forma estrutural e fonte dos AMPs utilizados no trabalho na construção de plataformas biossensoras	68
Figura 22 –	Feijão-de-porco, semente de onde é isolada a lectina concanavalina A (a), forma dimérica (b) e tetramérica (c) da concanavalina A	70
Figura 23 –	Representação esquemática da plataforma MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-Cys_ClavA	78
Figura 24 –	Imagens 3D (5.0 μm x 5.0 μm) via AFM da topografia do processo de modificação do ET. MBA (a), MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-Cys (b) e MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-Cys_ClavA (c)	78
Figura 25 –	Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do processo de montagem da plataforma sensora MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-Cys_ClavA	79
Figura 26 –	Resposta impedimétrica da detecção dos microrganismos pela plataforma MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-Cys_ClavA. ■10 ¹ UFC.mL, ●10 ² UFC.mL, ▲10 ³ UFC.mL, ▼10 ⁴ UFC.mL, ◆10 ⁵ UFC.mL, ►10 ⁶ UFC.mL	83
Figura 27 –	ΔR _{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos	85
Figura 28 –	Ilustração do processo de montagem do sistema sensor MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-APTES_T-PTA	86

Figura 29 –	Análise topográfica da plataforma sensora via AFM (5.0 μm x 5.0 μm). MBA (a), MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-APTES (b) e MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-APTES_T-PTA (c)	87
Figura 30 –	Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do processo de montagem da plataforma sensora MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-APTES_T-PTA	87
Figura 31 –	Voltamogramas cíclicos referentes à detecção das diferentes espécies de microrganismos de 10 ¹ a 10 ⁵ UFC mL. a) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603, b) <i>A. baumannii</i> UFPEDA10248, c) <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, d) <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, e) <i>C. albicans</i> ATCC 90028, f) <i>C. tropicalis</i> URM 5732	89
Figura 32 –	Diagramas de Nyquist referentes à detecção de microrganismos pela plataforma MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-APTES_T-PTA. a) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603, b) <i>A. baumannii</i> UFPEDA10248, c) <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, d) <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, e) <i>C. albicans</i> ATCC 90028, f) <i>C. tropicalis</i> URM 5732 ...	91
Figura 33 –	Variação relativa da R _{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos	94
Figura 34 –	Quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) após exposição a diferentes espécies de microrganismos em diferentes concentrações (10 ¹ -10 ⁵ UFC mL ⁻¹)	95
Figura 35 –	Representação esquemática da montagem do sistema sensor MBA_Fe ₃ O ₄ @Quit-SynoMP	96
Figura 36 –	Análise topográfica dos componentes do sistema sensor MBA_Fe ₃ O ₄ @Quit-SynoMP via AFM. a) MBA, b) Fe ₃ O ₄ @Quit-SynoMP	97
Figura 37 –	Análise voltamétrica (a) e impedimétrica (b) da montagem da plataforma sensora MBA_Fe ₃ O ₄ @Quit-SynoMP	97
Figura 38 –	Resposta impedimétrica da interação da plataforma biossensora frente a diferentes espécies de microrganismos. ■ 10 ¹ UFC.mL, ● 10 ² UFC.mL, ▲ 10 ³ UFC.mL, ▼ 10 ⁴ UFC.mL, ◆ 10 ⁵ UFC.mL	99
Figura 39 –	ΔR_{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos	102
Figura 40 –	Ilustração do processo de montagem dos sistemas sensores funcionalizados com a lectina ConA	103

Figura 41 –	Imagens topográficas 3D (5.0 μm x 5.0 μm) dos componentes da plataforma sensora avaliados via AFM. a) MBA, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES}$, c) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit}$, d) $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES_ConA}$, e) $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit_ConA}$	104
Figura 42 –	Imagens topográficas obtidas via AFM para os sensores após interação com microrganismos. Plataforma $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au_ConA}$: (a) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603; (b) <i>B. subtilis</i> ATCC 6633; (c) <i>E. faecalis</i> ATCC 29212. Plataforma $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit_ConA}$: (c) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603; (d) <i>B. subtilis</i> ATCC 6633; (e) <i>E. faecalis</i> ATCC 29212	104
Figura 43 –	Análise voltamétrica e impedimétrica do sistema sensor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit_ConA}$ (a) e (c), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au_ConA}$ (b) e (d)	105
Figura 44 –	ΔR_{CT} do sistema sensor $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit_ConA}$ (a) e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au_ConA}$ (b) após exposição a diferentes espécies de microrganismos	108
Figura 45 –	Quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) após exposição a diferentes espécies de microrganismos em diferentes concentrações (10^1 - 10^5 UFC mL^{-1})	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais métodos para identificação de microrganismos	27
Tabela 2 –	Peptídeos antimicrobianos e seres vivos de onde são isolados	65
Tabela 3 –	Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma biossensora MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-Cys_ClavA. Espécies Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b)	84
Tabela 4 –	Variação da corrente anódica (<i>i</i> _{PA}) da detecção das diferentes espécies de bactérias e fungos (10 ¹ -10 ⁵ UFC mL ⁻¹)	90
Tabela 5 –	Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma MBA_Fe ₃ O ₄ @Au-APTES_T-PTA	92
Tabela 6 –	Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma MBA_Fe ₃ O ₄ @Quit-SynoMP	100
Tabela 7 –	Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pelas plataformas com Fe ₃ O ₄ @Quit_ConA e Fe ₃ O ₄ @Au_ConA	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MBA	Ácido 4-mercaptobenzóico
LTA	Ácido teicóico
$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Ácido tetracloroáurico (III) trihidratado
APTES	Aminopropiltrietoxisilano
ϕ	Ângulo de fase
$A - \text{cm}^2$	Área de superfície do eletrodo
a_i amostra	Atividade dos íons na amostra
a_i^{ref}	Atividade iônica no eletrodo de referência
NaBH_4	Borohidreto de sódio
C_{DL}	Capacitância de dupla camada
Q	Carga
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
ClavA	Clavanina A
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de ferro (III) hexahidratado
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
$D_o - \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$	Coeficiente de difusão do analito oxidado
C_o	Concentração de espécies oxidantes
ConA	Concanavalina A
C_R	Concentração de espécies redutoras
$C^0 - \text{mol cm}^{-3}$	Concentração total do analito
$R - \text{K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$	Constante universal dos gases
CE	Contra-eletrodo
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
i	Corrente
AC	Corrente alternada
CC	Corrente contínua
i_{PA}	Corrente de pico anódica
i_{PC}	Corrente de pico catódica
i_c	Corrente do processo capacitivo
i_f	Corrente do processo faradaico

I_p	Correntes de pico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Frt	D-frutose
Glc	D-glicose
Man	D-manose
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
DCE	Dupla camada elétrica
ETEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágicas
CPE	Elemento de fase constante
GCE	Eletrodo de carbono vitreo
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
ISE	Eletrodos íon-sensíveis
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
W_f	Energia livre de Gibbs de ativação de reação para reações progressivas
W_b	Energia livre de Gibbs de ativação de reação para reações regressivas
ELFA	Ensaio enzimático fluorescente ligado a enzima
S	Enxofre
EPC	Equipamentos de proteção coletiva
EPI	Equipamentos de proteção individual
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
RIFTS	Espectroscopia de Transformada de Fourier de Interferência Refectométrica
Fc^+	Ferroceno oxidado
Fc	Ferroceno reduzido
Ox	Forma oxidada
Red	Forma reduzida
F-moc	Fluorenilmetiloxicarbonil
f	Frequência
Glut	Glutaraldeído
NH_4OH	Hidróxido de amônio
Z	Impedância

Z _w	Impedância de Warburg
IPCS	Infecção primária da sanguínea
ITU	Infecções do trato urinário
ISC	Infecções no sítio cirúrgico
IN	Infecções nosocomiais
Cys	L-cisteína
LPS	Lipopolissacarídeo
AFM	Microscopia de força atômica
Z	Módulo da impedância
MAM	Monocamadas automontadas
GICNAc	N-acetil-D-glicosamina
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AgNPs	Nanopartículas de prata
Fe ₃ O ₄	Nanopartículas magnéticas
MWCNTs	Nanotubos de carbono de parede múltiplas
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede única
EDC	N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
NHS	N-hidroxisuccinimida
Z _i	nº de elétrons participantes da reação redox
OMS	Organização Mundial da Saúde
GO	Óxido de grafeno
ITO	Óxido de índio dopado com estanho
Z _{im} / Z''	Parte imaginária da impedância
Z _{real} / Z'	Parte real da impedância
AMP	Peptídeos antimicrobianos
PEH	Plano Externo de Helmholtz
PIH	Plano Interno de Helmholtz
PAV	Pneumonia associada à ventilação mecânica
Pani	Polianilina
Ppy	Polipirrol
E	Potencial
V	Potencial aplicado
E ⁰	Potencial padrão das espécies

Ag/AgCl	Prata/cloreto de prata
Quit	Quitosana
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa
v_f	Reação progressiva
v_b	Reação regressiva
R_{CT}	Resistência a transferência de carga
R_s	Resistência da solução eletrolítica
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente à metilicina
IMS	Separação imunomagnética
ΔE_p	Separação pico-a-pico
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de ferro (II) heptahidratado
Syno-MP	Synoeca-MP
PBS	Tampão fosfato
T	Temperatura ilimitada
t	Tempo
T-PTA	Temporina-PTA
UFC.mL	Unidades formadoras de colônia por mL
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VPR	Voltametria de pulso reverso
VVL	Voltametria de varredura linear
WGA	do inglês <i>wheat germ agglutinin</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1.	Infecções por microrganismos	23
2.2.	Métodos tradicionais de detecção de microrganismos	26
2.3.	Biossensores	30
2.3.1.	Cinética eletroquímica e a Dupla Camada Elétrica	32
2.3.2.	Métodos de transdução eletroquímica	39
2.3.2.1.	Biossensores condutimétricos	39
2.3.2.2.	Biossensores amperométricos	40
2.3.2.2.1.	Voltametria cíclica (VC)	43
2.3.2.3.	Biossensores potenciométricos	46
2.3.2.4.	Biossensores Impedimétricos: Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)	48
2.3.3.	Microscopia de força atômica (AFM)	54
2.3.4.	Montagem de plataformas biossensoras eletroquímicas	56
2.3.4.1.	Estratégias de funcionalização de superfícies sensoras	57
2.3.4.1.1.	Monocamadas automontadas	57
2.3.4.1.2.	Nanopartículas e nanomateriais	59
2.3.4.1.3.	Imobilização de biorreceptores em superfícies	63
2.3.4.1.4.	Peptídeos antimicrobianos	65
2.3.4.1.5.	Lectinas	69
3.	OBJETIVOS	71
3.1.	Objetivo Geral	71
3.2.	Objetivos Específicos.....	71
4	MÉTODO	72
4.1	Materiais	72
4.2	Síntese e funcionalização e nanopartículas magnéticas	72
4.3	Montagem das plataformas sensoras nanoestruturadas ...	74
4.3.1	Plataforma MBA_ Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA	74
4.3.2.	Plataforma MBA_ Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA	75

4.3.3.	Plataforma MBA_Fe₃O₄@Quit-ConA e MBA_Fe₃O₄@Quit-SynoMP	75
4.4.	Cepas de microrganismos e meios de cultura	75
4.5.	Microscopia de força atômica	76
4.6.	Caracterização eletroquímica	76
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1.	Sensor ClavA	78
5.1.1.	Análise morfológica	78
5.1.2.	Caracterização eletroquímica da plataforma sensora ...	79
5.1.3.	Detecção de microrganismos	82
5.2.	Sensor Temporina-PTA	86
5.2.1.	Análise morfológica	86
5.2.2.	Caracterização eletroquímica da plataforma sensora MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA	87
5.2.3.	Performance analítica do sensor	89
5.3.	Sensor Synoeca-MP	96
5.3.1.	Análise morfológica	96
5.3.2.	Caracterização eletroquímica da plataforma sensora ...	97
5.3.3.	Detecção dos microrganismos alvo	98
5.4.	Sensor Concanavalina A	102
5.4.1.	Análise morfológica da plataforma sensora MBA_Fe₃O₄@Au_ConA e MBA_Fe₃O₄@Quit_ConA	103
5.4.2.	Caracterização eletroquímica das plataformas	105
5.4.3.	Análise eletroquímica do biossensor frente a microrganismos	107
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	112
7	REFERÊNCIAS	114
APÊNDICE A –	PATENTE 1 - DISPOSITIVO NANOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO ATRAVÉS DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO.	133
APÊNDICE B –	PATENTE 2 - PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARO E USO	183

	DO MESMO	
APÊNDICE C –	PATENTE 3 - BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS	210
APÊNDICE D –	ARTIGO 1 - CONCANAVALIN A DIFFERENTIATES GRAM POSITIVE BACTERIA THROUGH HIERARCHIZED NANOSTRUCTURED TRANSDUCER ..	242
APÊNDICE E –	ARTIGO 2 - ELECTROCHEMICAL DETECTION OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA THROUGH MASTOPARAN-CAPPED MAGNETIC NANOPARTICLE.	252
APÊNDICE F –	ARTIGO 3 - ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON TEMPORIN-PTA PEPTIDE FOR DETECTION OF MICROORGANISMS	261

1. INTRODUÇÃO

O avanço da pesquisa biomédica no presente milênio permite que diferentes abordagens possam ser aplicadas para uma mesma área, resultando em alternativas inovadoras que apresentam resultado igual ou superior que o demonstrado por metodologias tradicionais. O campo diagnóstico tem auxiliado na identificação de moléculas e microrganismos anteriormente desconhecidos, onde após a criação do microscópio e conhecimento sobre específicas reações químicas e sua consequência no corpo humano, houve a possibilidade da rápida intervenção clínica com a abordagem mais apropriada.

Distintas doenças e pandemias que ocorreram nos últimos séculos são apenas uma fração das diversas doenças existentes causadas por microrganismos, sendo essas as que acometem principalmente países em desenvolvimento. Problema maior se refere a inesperadas pandemias futuras, onde o campo da ciência, tecnologia e inovação precisam se unir para estudar, identificar e combater tais ameaças. O mundo não estava preparado para a pandemia da COVID-19, e uma nova pandemia causada por um novo e desconhecido agente etiológico poderia resultar em efeitos devastadores na humanidade tanto a nível biológico quanto econômico.

Dessarte, a rápida e eficiente identificação desses microrganismos visa a total interrupção ou pelo menos retardar o seu avanço, principalmente no que diz respeito a fornecer tempo para o desenvolvimento de novas tecnologias que possam combatê-los e exterminá-los definitivamente. De antemão, é sabido que o problema da resistência a antimicrobianos e a medicamentos antivirais é uma realidade que ainda não foi vencida apesar de todo progresso médico e tecnologias presentes no século XXI (TRASTOY et al., 2020). Microrganismos como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida* spp., etc. que outrora eram facilmente eliminados com antibióticos e antifúngicos de amplo espectro, atualmente apresentam uma resistência a essas alternativas tradicionais. Como exemplo mais estudado, pode-se destacar o *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), e diferentes cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (ETEC), principalmente a do sorotipo O157:H7 e a O104:H4 (MOHAMED et al., 2020).

Na presente década, alguns tópicos destacando os microrganismos como potencial ameaça à saúde humana ressaltam a importância de sua rápida

identificação. O bioterrorismo, a contaminação de alimentos e da água, além dos casos crescentes de infecções nosocomiais seguem sendo um alvo constante de pesquisas, onde, em sua maioria, ferramentas inovadoras são requisitadas tanto para o combate quanto para a prévia identificação e diagnóstico desses agentes contaminantes.

Se destacando como uma via promissora na identificação de múltiplos analitos de interesse clínico diante de métodos bem estabelecidos na literatura como o ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e técnicas moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas variações, estão os biossensores eletroquímicos. Sua fácil construção, baixo custo e uso de variadas moléculas de biorreconhecimento evidenciam seu potencial, sendo espelhado no crescente mercado diagnóstico.

Nos biossensores, as moléculas de biorreconhecimento utilizadas de origem natural ou sintética/bioinspirada como anticorpos, peptídeos/proteínas, fragmentos de DNA/RNA, enzimas etc. podem ser direcionadas para determinado alvo terapêutico, sendo esta interação analito-alvo evidenciada por diferentes técnicas, onde a abordagem eletroquímica é a preferível haja vista a sensibilidade e simplicidade na análise. Inicialmente direcionadas para outros objetivos, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) (peptídeos que agem como primeira linha de defesa de múltiplos organismos vivos) e lectinas (glicoproteínas isoladas de diferentes organismos, com destaque a plantas) mostraram elevado potencial de interação com microrganismos. No caso dos AMPs, tal interação resume-se pela inicial atração eletrostática e posterior inserção na parede celular microbiana, e das lectinas, ligação com resíduos de específicos carboidratos presentes na parede celular, sendo as diferentes composições dessa parede que resulta nas diferentes respostas na detecção, favorecendo a diferenciação das espécies.

Dessa forma, o presente trabalho visou o desenvolvimento de biodispositivos sensores eletroquímicos baseados em moléculas bioinspiradas como os AMPs clavanina A (ClavA), synoeca-MP (Syno-MP) e temporina-PTA (T-PTA), além da lectina concanavalina A (ConA) com foco na detecção de microrganismos em meios aquosos. A tese foi dividida em seis capítulos, onde o capítulo 1 ressalta a motivação para o exercício das atividades desenvolvidas, seguido pelo capítulo 2 com uma

revisão da literatura dos principais pontos abordados no estudo, destacando microrganismos e seus principais métodos de diagnóstico, biossensores e seus componentes, principais técnicas eletroquímicas com foco na voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Finalmente há a descrição dos métodos de funcionalização de nanopartículas e superfícies sensoras e elementos de biorreconhecimento, com enfoque em AMPs e lectinas. O capítulo 3 relata os objetivos para realização da tese, o capítulo 4 apresenta os materiais e as metodologias utilizadas nos experimentos e técnicas de caracterização. O capítulo 5 exhibe os resultados relacionados à montagem das plataformas biossensores baseadas em peptídeos e lectinas e posterior detecção de microrganismos, dentre eles bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos do gênero *Candida* spp. O capítulo 6 expõe as conclusões e perspectivas futuras e por fim, o capítulo 7 apresenta as produções científicas na forma de artigo e patentes depositadas produzidas no decorrer do projeto.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Infecções por microrganismos

No século XVII, até então desconhecido pela humanidade, um “mundo invisível” se fazia presente em nosso meio. Em 1676, o holandês Antoine Philips van Leeuwenhoek identificou microrganismos pela primeira vez através de sua inovadora invenção: o microscópio, revolucionando os campos da medicina e biologia. Ainda não considerada um método de diagnóstico na época, o microscópio criado por Leeuwenhoek – constituído de uma simples lente de vidro e uma fonte primitiva de luz – foi capaz de discernir entre diferentes formas de bactérias presentes na boca humana, onde posteriormente visualizou com razoável nitidez os eritrócitos presentes no sangue humano.

Tal mundo, invisível ao olho nu, foi responsável por milhões de mortes no decorrer dos séculos, onde bactérias, fungos e vírus se encontram como principais causadores de inúmeras pandemias. Destarte, alguns eventos pandêmicos marcaram época, dentre os quais podem-se destacar a praga Ateniense (430 a. C.), a praga de Justiniano (em meados do século VI), a peste negra (em meados do século XIV), a gripe espanhola (1918 – 1920), SARS (2002 – 2003), H1N1/09 “Gripe suína” (2009), o surto do Ebola (2014 – 2016), ZIKA (2015 – 2016), dentre outros exemplos, sendo o mais recente o caso da COVID-19 (HUREMOVIĆ, 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (2019 – presente) foi iniciada como um grupo de casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, onde a rapidamente se alastrou em todos os continentes. No dia 12 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou a COVID-19 como uma pandemia mundial (GUARNER, 2020). Até o mês de abril de 2021, agente infeccioso causador da COVID-19, o Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), foi responsável por mais de 140 milhões de casos mundialmente, com mais de 3 milhões de óbitos confirmados.

No Brasil, a pandemia alcançou alarmantes 12 milhões de casos, resultando em mais de 290 mil mortes. A corrida por métodos de diagnóstico rápidos e de baixo custo (além de uma vacina eficiente, com atividade prolongada, além de segura)

segue sendo realizada por diversas companhias, centros e laboratórios de pesquisa, visando uma opção mais palpável à população contra o considerado padrão-ouro, a reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) (UDUGAMA et al., 2020).

Um tema pouco retratado ultimamente se trata de infecções bacterianas transmitidas por microrganismos presentes na água. De acordo com a OMS, na última década, mais de 2 milhões de pessoas morriam anualmente em decorrência de doenças de origem oral-fecal, em sua maioria, ocasionadas por enterobactérias (SINGH et al., 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Dentre estes microrganismos e seus efeitos nocivos à saúde, pode-se destacar o *Enterococcus* spp. (síndrome do choque tóxico), *Salmonella* spp. (salmonelose, febre tifóide), *Escherichia coli* enterotoxigênica (gastroenterite), *E. coli* enterohemorrágica (Síndrome hemolítica urêmica), *Helicobacter pylori* (gastrite e úlceras), *Vibrio cholerae* (cólera), etc. (MAGANA-ARACHCHI; WANIGATUNGE, 2020). Os principais fatores que ocasionam tais problemas, mesmo em países desenvolvidos, se trata de hábitos de má higiene, cuidado e sanitização da água de rios e mares, além da carência de ferramentas eficientes na detecção e erradicação dos agentes contaminantes em tempo oportuno (MBUYA; HUMPHREY, 2016).

A segurança alimentar é um outro ponto amplamente associado ao elevado número de mortes humanas e de animais, além de resultar também na perda econômica. A incidência de contaminação e intoxicação alimentar através de microrganismos destaca, a nível global, um quadro difícil de determinar por conta dos números algumas vezes não registrados, principalmente nos países em desenvolvimento, entretanto, estima-se cerca de 600 milhões de casos anuais, dentre os quais ocorrem mais de 40 mil mortes (HAVELAAR et al., 2015).

Outro problema de saúde pública onde países desenvolvidos e àqueles em desenvolvimento, como o Brasil, ainda enfrentam em pleno século XXI se trata de infecções adquiridas no ambiente hospitalar, também conhecidas como infecções nosocomiais (IN). De maneira geral, uma infecção ocasionada por microrganismos é considerada IN quando o paciente entra em cuidados médicos no hospital ou qualquer centro de saúde, onde, por sua vez, tal contaminação não estava presente no momento da admissão (MONEGRO; MUPPIDI; REGUNATH, 2020). Em adição, as

manifestações clínicas de uma IN ocorrem após pelo menos 48h. É estimado que dentre 100 pacientes hospitalizados, 7 e 10 são contaminados por algum microrganismo decorrente de IN em países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento, respectivamente (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

Devido a frequência de casos e por acometer os 5 continentes, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) realiza uma vigilância vigorosa dessas infecções a fim de monitorar quais microrganismos infectantes estão mais associados a determinada prática hospitalar que resultam em IN, além de desenvolver alternativas que resultem no aprimoramento da segurança do paciente (MONEGRO; MUPPIDI; REGUNATH, 2020). Dentre as IN mais corriqueiras, enfatiza-se a frequência de casos de infecção primária da sanguínea (IPCS) associada ao uso de cateter, infecções do trato urinário (ITU) associado ao uso de cateter, infecções no sítio cirúrgico (ISC) e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (BOEV; KISS, 2017). Além das bactérias, leveduras do gênero *Candida* spp. também são amplamente encontradas em casos de IN, onde ocupa as primeiras colocações em frequência de casos de IPCS e ITU, principalmente dentre pacientes imunocomprometidos e recém-nascidos (SULEYMAN; ALANGADEN, 2016).

A rápida detecção e identificação de microrganismos nocivos à saúde humana e animal é crucial para evitar crises sanitárias, uma vez que, além de melhorar a qualidade de vida, resulta na proteção econômica da região. Tal fato está diretamente relacionado à confiança do uso da água (tanto no âmbito à associação alimentar quanto ao uso recreativo), bem como da compra de alimentos de origem animal e industrializados e ida regular ao ambiente clínico-hospitalar. Este último destacou uma alarmante situação ao redor do mundo em 2020, pois com a rápida disseminação do SARS-CoV-2, o pânico de ser infectado por um vírus de origem desconhecida e sem um tratamento específico ou vacina com eficácia reconhecidamente comprovada fez com que a população deixasse de realizar consultas e outras atividades em hospitais e clínicas (SHIN et al., 2020).

Como resultado, hospitais e sistemas de saúde enfrentam um impacto econômico sem precedentes relacionado a diminuição de consultas presenciais, desistências de procedimentos cirúrgicos e de qualquer prática que requer a presença do paciente (SPINELLI; PELLINO, 2020). Impacto maior se refere à compra de

equipamentos de proteção individual (EPI), coletiva (EPC) e ventilação mecânica, adequação do ambiente clínico para receber pacientes infectados, além de treinamento do estafe e gastos com a testagem em massa por métodos tradicionais como imunocromatografia de fluxo lateral e a RT-PCR (RANNEY; GRIFFETH; JHA, 2020; SURKOVA; NIKOLAYEVSKYY; DROBNIEWSKI, 2020).

As citadas situações reivindicam alternativas inovadoras que possam ser aplicadas pelo próprio indivíduo e que apresentem uma metodologia simples e efetiva, uma vez que métodos tradicionais de identificação e reconhecimento de microrganismos como bactérias, fungos e vírus requerem um ambiente próprio e equipe especializada, além de equipamentos e reagentes de alto-custo.

2.2. Métodos tradicionais de detecção de microrganismos

No decorrer dos séculos, os microrganismos se tornaram uma figura presente no dia a dia da sociedade, incluindo razões negativas e positivas. Áreas como biotecnologia, engenharia de alimentos, medicina, engenharia genética, dentre outros exemplos, viram seus campos de estudo se expandirem com a utilização de bactérias e fungos na produção de bebidas, antibióticos e múltiplos compostos terapêuticos, além da geração de energia pela produção de biogás e etanol (CANDEO et al., 2020; VITORINO; BESSA, 2017). Por outro lado, características intrínsecas na estrutura genética e peculiaridades bioquímicas tornam os microrganismos como ameaças à saúde humana. Para ser considerado um patógeno, o organismo invasor causa determinada doença no hospedeiro cuja severidade varia de acordo com a espécie, onde taxonomicamente, compreendem, em sua maioria, bactérias, vírus e eucariotos uni e multicelulares.

É sabido que a vasta maioria dos microrganismos presentes no mundo não apresentam efeitos negativos, apesar de se presumir a existência de mais de um trilhão de diferentes espécies, onde grande parte sequer foi estudada e caracterizada (BALLOUX; VAN DORP, 2017). Por outro lado, estima-se que cerca de 1400 patógenos foram descritos por causar doenças em humanos (dentre eles, bactérias, vírus, protozoários, fungos e helmintos), sejam por transmissão zoonótica, quanto no consumo de alimentos e interação com ambiente contaminado (KHAN et al., 2019).

A correta identificação dos microrganismos requer métodos efetivos e simples que possam monitorar o uso adequado de determinadas espécies na área alimentícia e biotecnológica, bem como a rápida detecção de espécies nocivas, sendo esta última um fator determinante no diagnóstico e prevenção de doenças. A Tabela 1 destaca alguns dos principais métodos utilizados na identificação de microrganismos, separando-os em cultura em meios enriquecidos, técnicas microscópicas, técnicas bioquímicas e técnicas moleculares.

Tabela 1 – Principais métodos para identificação de microrganismos.

Meios cromogênicos	Técnicas microscópicas	Técnicas bioquímicas	Técnicas moleculares
Meios de cultura tradicionais	Microscopias (campo claro e escuro) MEV MET AFM Microscopia confocal de varredura a laser	Tradicionais (meios sólidos, semissólidos e caldos, cartão de Wickerham, Vitek, Fitas API) Espectrometria de Massa (GC-MS, LC-MS, MALDI-TOF, ESI-MS) Espectrometria (FTIR, Raman)	PCR RT-qPCR RAPD-PCR RFLP PFGE WGS

Métodos tradicionais como cultura em meios sólidos, semissólidos e contagem de colônias ainda permanecem sendo amplamente utilizadas. Tal técnica tem como objetivo inicial a obtenção de uma cultura pura, portanto, contendo apenas um tipo de microrganismo. O isolamento da espécie microbiana segue abordagens como semeio em meio sólido por picagem profunda e diluição em meio líquido. O semeio por exaustão de nutrientes em meio sólido continua em uso até o presente em algumas clínicas pela simplicidade da obtenção de colônias microbianas (FRANCO-DUARTE et al., 2019). Em adição, associadas a essas técnicas, também pode ser obtida a caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica, entretanto, são necessários de 48h a 72h para se ter um resultado confiável, além de requerer um trabalho intensivo e uso elevado de vidrarias e materiais para o preparo dos meios e testes bioquímicos

(HAMEED; XIE; YING, 2018). Consequentemente, ensaios baseados em cultura são considerados inadequados para a análise de água e alimentos por requererem resultados imediatos.

Sendo um dos primeiros instrumentos utilizados na identificação de microrganismos, as técnicas microscópicas se tornaram uma ferramenta essencial em centros de saúde por possibilitarem a análise da forma, movimentação e classificação desses seres. A avaliação das diferentes características estruturais de bactérias, tais como estreptococos, estafilococos, bacilos etc., auxiliaram na divisão mais ampla e detalhada das bactérias, fungos, protozoários e outros microrganismos, principalmente daqueles frequentemente associados à contaminação em humanos e animais (PITT; BARER, 2012). Entretanto, utilizar a microscopia como única fonte diagnóstica não é suficiente, pois algumas espécies apresentam similaridades de estrutura, além da coloração de Gram não ser considerada um método definitivo de análise microbiológica. Além disso, procariotos ostentam tamanhos variados e alguns tipos celulares sequer chegam perto da resolução máxima de um microscópio de luz (FRANCO-DUARTE et al., 2019). Dessa forma, quando técnicas microscópicas são associadas a outras alternativas de diagnóstico, seu uso se torna mais efetivo.

A coloração de Gram por si só já desencadeou uma revolução na microbiologia por distinguir microrganismos pelas características estruturais e composição da parede celular, entretanto, visto o crescente número de espécies, além dos milhares outras desconhecidas, tal técnica se mostra insuficiente na avaliação microbiológica. Logo, testes bioquímicos se tornaram um companheiro quase que inseparável das opções tradicionais de cultura e isolamento de colônias. Dentre os testes bioquímicos mais utilizados, podem se destacar a fermentação de carboidratos, atividade de celulase e catalase, teste do vermelho de metila, teste do citrato de Simmons, teste de oxidação/fermentação para diferenciação dentre microrganismos anaeróbicos e aeróbicos etc. (HAMEED; XIE; YING, 2018).

Muitas empresas desenvolveram testes rápidos para a análise bioquímica onde substratos são fixados em cartões facilitam as atividades no ambiente clínico pelo uso simples, rapidez na análise e por não requerer vidrarias e reagente dispendiosos. Entretanto, a frequência de respostas inconclusivas, elevadas taxas de resultados falso-positivos e custo, resultaram na diminuição da busca por essas alternativas e

regressão às opções convencionais (FRANCO-DUARTE et al., 2019; RIZAL et al., 2020).

O método imunológico se destaca em diversas práticas clínicas, onde o ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se baseia na especificidade desencadeada pela interação antígeno-anticorpo, facilmente identificadas por meio de reações enzimáticas, geralmente resultando na mudança de cor dos poços em teste. Apesar de suas vantagens como especificidade, sensibilidade e uso automatizado, o ELISA e seus variantes como o ensaio enzimático fluorescente ligado a enzima (ELFA) e separação imunomagnética (IMS) apresenta custo relativamente elevado e não é designado para a detecção de uma ampla variedade de patógenos, sendo direcionado apenas para algumas espécies (HOSSEINI et al., 2017).

Como descrito nos parágrafos anteriores, a identificação e caracterização de patógenos microscópicos se dá principalmente por metodologias com observação fenotípica e bioquímicas, se estabelecendo no isolamento e cultura de células, entretanto, abordagens moleculares têm ganhado protagonismo em especial por conta da elevada sensibilidade. A área clínica e de pesquisa faz uso de ferramentas moleculares em estudos microbiológicos para avaliar, por exemplo, a virulência bacteriana e fúngica, patogênese, resistência a antimicrobianos, além da identificação de espécies emergentes, reemergentes e novas espécies (RAJAPAKSHA et al., 2019). Em adição, o método molecular permitiu o estudo e caracterização de espécies incultiváveis e facilitou a determinação da taxonomia de espécies desconhecidas (PURTY; CHATTERJEE, 2016).

De modo geral, métodos moleculares voltados à microbiologia clínica variam da amplificação de oligonucleotídeos específicos como na reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas variantes (PCR em tempo real, RAPD-PCR), a métodos mais complexos baseados na análise de genes específicos e sequenciamento do genoma (ROSSEN; FRIEDRICH; MORAN-GILAD, 2018). Apesar de todos os benefícios das técnicas moleculares, para a obtenção dos resultados são necessários de horas a dias de análises, além do alto custo de equipamentos, reagentes e de depender de usuários extremamente treinados. Ademais, as amostras clínicas precisam de um tratamento inicial com purificação das mesmas (HOYOS-NOGUÉS; GIL; MAS-MORUNO, 2018).

Diante do exposto, fica claro a demanda urgente para novas opções de métodos diagnósticos para a detecção e identificação de microrganismos de interesse clínico e seus componentes que disponham de características como baixo custo e elevada sensibilidade. Os biossensores se destacam como alternativa inovadora na detecção de patógenos por exibir além das características citadas acima, atributos úteis no diagnóstico microbiológico como especificidade, possibilidade de miniaturização, além de rápida análise e obtenção de resultados, permitindo ao analista verificar de maneira imediata uma infecção e direcionar o tratamento mais adequado.

2.3. Biossensores

Os humanos como um todo apresentam sensores que percebem e reconhecem o ambiente em que estão presentes. De forma geral, sensores são dispositivos que reagem a uma ação perceptível como a luz, pressão e calor, onde o cérebro atua como um moderno supercomputador, processando milhares de sinais de vários locais do corpo a cada segundo. A fins comparativos, *smartphones* incorporam múltiplos sensores em seu interior, como o giroscópio, acelerômetro, barômetro e magnetômetro para apresentar de maneira rápida e simplificada a localização exata do usuário, e da mesma forma, os “sentidos” mais popularmente conhecidos como tato, olfato, visão, paladar e audição são o resultado de inúmeras funções sensoriais trabalhando em conjunto no corpo humano resultando em variadas percepções (ZHOU; YANG; LI, 2019).

Uma das primeiras aplicações de dispositivos sensores voltados para a área da saúde ocorreu em 1962, onde Clark e Lyons desenvolveram um sensor para a detecção de glicose no plasma sanguíneo por transdução potenciométrica e utilizando a enzima glicose oxidase como a molécula responsável pelo biorreconhecimento do analito alvo (CLARK; LYONS, 1962). Tais sensores biológicos, mais conhecidos como “biossensores”, são basicamente dispositivos que detectam mudanças bioquímicas e fisiológicas em uma superfície funcional. Com o passar das décadas, o mercado de biossensores cresceu consideravelmente, atingindo a surpreendente marca de mais de US\$ 11 bilhões em 2013, onde com novas descobertas e aplicações na área

humana e animal, continuou ascendente e estimou-se um crescimento de mais de US\$ 22 bilhões para o ano de 2020 (NEETHIRAJAN et al., 2017).

De forma geral, um biossensor é caracterizado por integrar os seguintes componentes (SHARMA et al., 2019), como demonstrado na Fig. 1:

- Biorreceptor ou elemento de biorreconhecimento, responsável por se ligar especificamente ao analito;
- Uma superfície funcional onde o biorreceptor e demais componentes da plataforma sensora serão imobilizados, resultando na origem de um sinal mensurável após interação com o analito-alvo;
- Um transdutor, com o objetivo de “traduzir” o sinal gerado, convertendo-o a um sinal eletrônico proporcional à concentração do analito presente na amostra e amplificado por um circuito detector;
- Software de computador por onde o operador humano avaliará o resultado obtido.

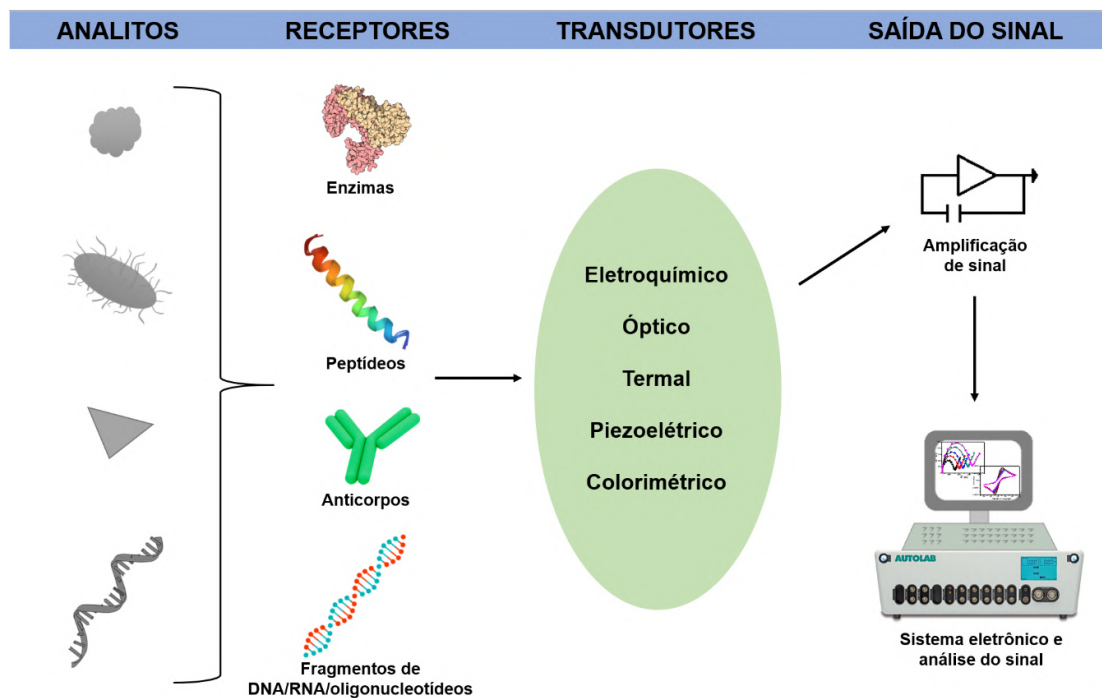


Figura 1 – Elementos e componentes de um típico biossensor. Fonte: Próprio autor.

Uma ampla variedade de saídas transdutoras têm sido utilizadas no desenvolvimento de biossensores, onde se destacam alternativas ópticas (baseadas em absorbância, luminescência, quimiluminescência e plásmons de superfície) (LIN

et al., 2020; ZHOU et al., 2019), de massa (piezoelétrico e magnetoelétrico) (POHANKA, 2019; WU et al., 2018), termométricos (TAZWAR, 2019) e de sinal eletroquímico (SILVA JUNIOR et al., 2018; SIMÃO et al., 2020). Dentre estes, a abordagem eletroquímica se destaca por dispor de dispositivos de fácil uso, econômicos, portáteis e miniaturizados. Em adição, ferramentas de análise eletroquímica apresentam elevado potencial de mercado por exibir uma análise simples e sensível das reações que ocorrem no substrato sensor, podendo ser monitoradas e detectadas pelas variações de potencial, corrente, capacitância e especialmente na impedância na transferência de elétrons (ENSAFI, 2019).

2.3.1. Cinética eletroquímica e a dupla camada elétrica

Pode-se definir eletroquímica com o estudo de reações químicas que ocorrem na interface de um condutor eletrônico (o eletrodo) e um condutor iônico (o eletrólito) (SCHMICKLER; SANTOS, 2010). Tais reações envolvem processos de oxidação e redução das espécies eletroativas por meio da transferência de elétrons na interface existente entre a superfície de um eletrodo e o eletrólito. Habitualmente, o local de ocorrência dessas reações é chamado de célula eletroquímica, cuja constituição consiste nos seguintes itens, como destacado na Fig. 2 (FARIDBOD; NOROUZI; GANJALI, 2015):

- **Eletrodo** – dispositivo caracterizado por ter uma superfície condutora de elétrons, local onde ocorrem as reações eletroquímicas e as principais trocas de elétrons;
- **Eletrólito** – condutor iônico o qual, por conter íons, permite a livre movimentação deles entre os eletrodos presentes na reação;
- **Compartimento/câmara** – local onde são dispostos os eletrodos e eletrólitos. Geralmente constituído de vidro temperado e teflon, sendo a câmara conhecida como gaiola de Faraday;
- **Potenciostato/circuito elétrico externo** – local de inserção dos eletrodos, controle e detecção da variação do potencial e corrente.

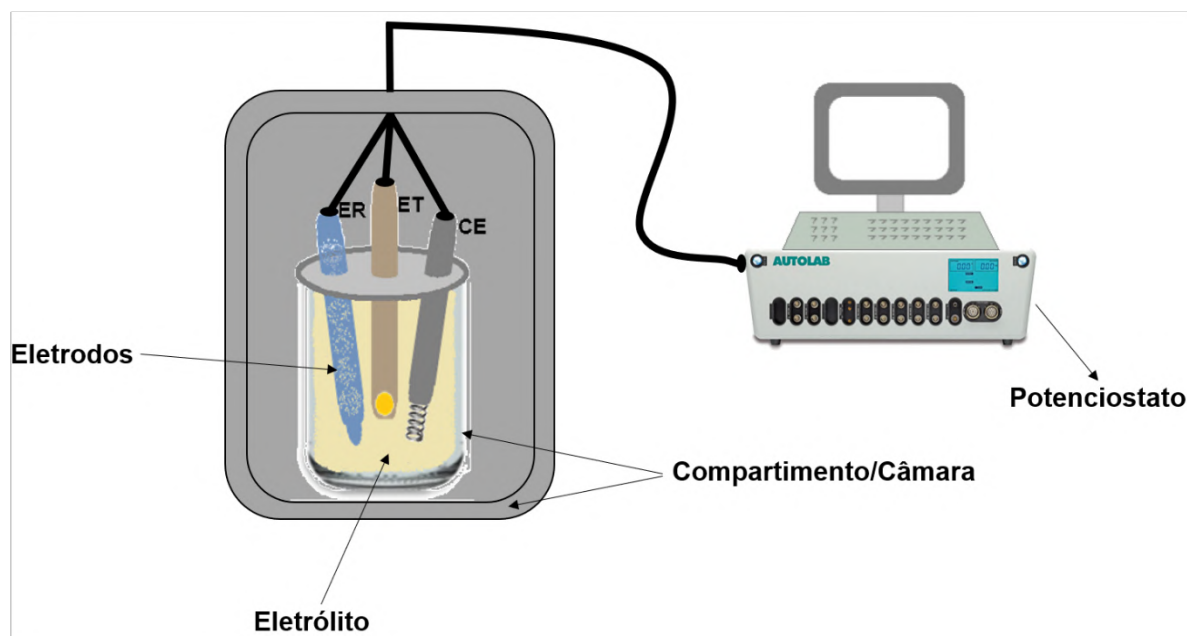


Figura 2 – Principais componentes presentes na bancada de experimentos de biossensores. Fonte: Próprio autor.

Uma vez que biossensores eletroquímicos, em sua maioria, são analisados na superfície de um eletrodo, tal substrato desempenha um papel crucial na performance de uma plataforma sensora, onde a detecção é afetada diretamente pela composição, geometria e a funcionalização da superfície do eletrodo (REZAEI; IRANNEJAD, 2019).

Na pesquisa de sistemas eletroquímicos, diferentes eletrodos com funções específicas são utilizados, onde a ordem e quantidade diferem entre si a depender da finalidade.

Os eletrodos mais utilizados na investigação bioeletroquímica são:

- **Eletrodo de trabalho (ET)** – local de montagem das plataformas biossensoras e onde ocorre as reações de interesse. O uso de materiais inertes como ouro, prata, carbono, carbono vítreo (GCE) etc. são os mais indicados e utilizados como superfície funcional, que passa a corrente para as espécies eletroativas sem ser afetada por ela. A depender da aplicação, o tamanho e forma do ET pode variar;
- **Contra-eletrodo (CE)** – é o eletrodo que completa o caminho da corrente na célula eletroquímica. Na maioria dos experimentos eletroquímicos, é necessário um CE constituído de um material inerte como grafite e fio de platina. Em adição, uma vez que a corrente flui entre o ET e CE, a área de

superfície do CE deve ser maior que a área do ET para se obter a análise da cinética eletroquímica mais estável;

- **Eletrodo de referência (ER)** – fornece um potencial estável e conhecido durante o teste, sendo ele o ponto de referência para a medida e controle do potencial na célula eletroquímica. Importante destacar que a corrente elétrica não passa pelo ER ($i = 0$). Dentre os mais utilizados, destacam-se o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), mercúrio/óxido de mercúrio (Hg/HgO), calomelano saturado (SCE) e cobre/sulfato de cobre (CSE).

A depender da técnica e finalidade, a quantidade de eletrodos em um sistema eletroquímico pode variar. Dessa forma, diferentes configurações de eletrodos podem ser utilizadas como observado na Fig. 3 (AUTOLAB, 2011), a saber:

- **Célula eletroquímica de 2 eletrodos** – são utilizados apenas o CE e ET. Tal sistema pode ser usado em estudos de armazenamento de energia ou dispositivos de conversão como baterias e painéis fotovoltaicos, além de supercapacitores;
- **Célula eletroquímica de 3 eletrodos** – é a opção mais aplicada em investigações eletroquímicas e na elaboração de biossensores. São utilizados o ET, ER e CE, onde a corrente flui entre o CE e ET e a diferença de potencial é medida entre o RE e WE. O potencial na interface no ET é controlado em relação ao ER (que exibe um potencial constante);
- **Célula eletroquímica de 4 eletrodos** – o tipo menos explorado, aqui, além do WE e CE, dois ER são usados. Usado principalmente para aplicações onde a diferença de potencial ocorre como resultado da passagem da corrente através de uma interface bem definida (entre o ET e CE). É mais indicado em medida de potencial entre duas fases imiscíveis ou, mais frequentemente, separadas por uma fina membrana. Tal configuração permite calcular a resistência da interface em análise e condutividade da membrana.

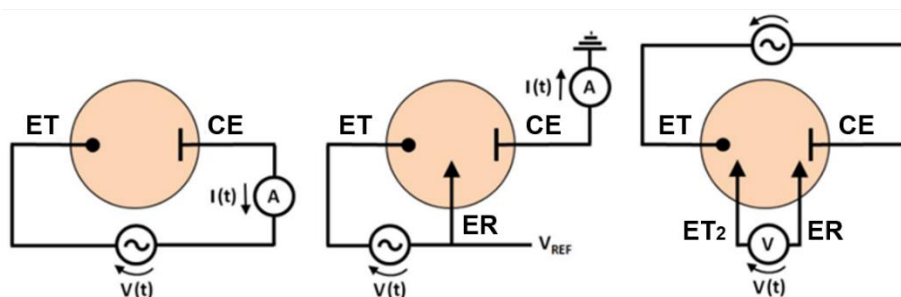


Figura 3 – Configurações/organização de eletrodos usados em estudos eletroquímicos. Fonte: Adaptado de GROSSI; RICCÒ, 2017.

A cinética envolvendo uma reação eletroquímica ocorre basicamente na forma de corrente de elétrons na interface eletrodo/solução eletrolítica, onde tal reação envolve espécies eletroativas que podem ser formuladas como segue na Eq. 1:



Onde Ox e Red são as formas oxidada e reduzida do par redox, respectivamente e valor de n geralmente é ≈ 1 . Como demonstrado na Fig. 4, em uma reação de transferência de elétrons na superfície do eletrodo, apenas as espécies oxidantes com a concentração de $C_O(0,t)$ e espécies redutoras com concentração de $C_R(0,t)$ na interface eletrodo/solução podem participar da reação (t = tempo de reação). Por outro lado, aquelas espécies oxidantes e redutoras que se encontram distantes do eletrodo terão que se difundir para a superfície do mesmo a fim de participarem da reação eletroquímica [$C_O(x,t)$ e $C_R(x,t)$, respectivamente] (WANG, 2006).

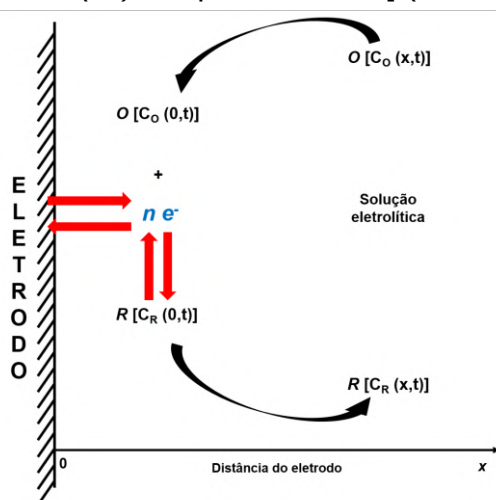


Figura 4 – Esquema do processo de transferência de elétrons no eletrodo e difusão das espécies eletroativas. Fonte: Próprio autor.

Dessa forma, as taxas de reação progressiva “ v_f ” (oxidação → redução) e regressiva “ v_b ” (redução → oxidação) pode ser expresso como descrito nas Equações 2 e 3:

$$v_f = k_f C_O(0, t) \quad \text{Eq. 2}$$

$$v_b = k_b C_R(0, t) \quad \text{Eq. 3}$$

onde a partir do momento em que a reação alcança equilíbrio ($v_f = v_b$), temos como resultado a Equação 4:

$$k_f C_O(0, t) = k_b C_R(0, t) \quad \text{Eq. 4}$$

Assim, para quaisquer reações químicas ou eletroquímicas, como as observadas em biossensores, as constantes da taxa de reação nas equações 2 e 3 podem ser expressas como na forma de Arrhenius (Equação 5 e 6):

$$k_f = A_f \exp\left(-\frac{W_f}{RT}\right) \quad \text{Eq. 5}$$

$$k_b = A_b \exp\left(-\frac{W_b}{RT}\right) \quad \text{Eq. 6}$$

onde A_f e A_b são as constantes de Arrhenius representando a constante da taxa de reação representando as reações progressivas e regressivas em temperatura ilimitada (T), constante universal dos gases (R), W_f e W_b são as energias livres de Gibbs de ativação de reação para as reações progressivas e regressivas para a equação 1 (CAI et al., 2014; RAHMAN et al., 2018).

Assim, na cinética eletroquímica ocorrendo na superfície de um eletrodo, qualquer material que seja adsorvido à superfície do mesmo alterará os processos de transporte e difusão dos reatantes do seio da solução para a interface. Tais alterações influenciarão diretamente na dupla camada elétrica (DCE) criada na interface eletrodo-solução. Diferentes técnicas eletroquímicas desempenham o papel de detectar essas variações da interface, onde as mais exploradas identificam as variações de corrente

(i), potencial (E) e a resistência à transferência de elétrons criada por essa camada recobrando o eletrodo, seja ela algum composto químico ou material de origem biológica.

Uma vez que as alterações ocorrendo na superfície do eletrodo resultam na mudança da resposta eletroquímica, é importante conhecer a camada existente na interface eletrodo-eletrólito. O termo “DCE” é estabelecido como uma interface de uma superfície carregada e uma fase líquida onde a eletroneutralidade é alterada, resultando na existência de um campo elétrico. Tal evento resulta na mudança da localização e orientação de íons presentes no líquido a fim de reduzir os efeitos do campo elétrico formado (KHADEMI; BARZ, 2020). A DCE é formada simultaneamente logo após o contato do eletrodo com a solução eletrolítica.

Como observado na Fig. 5, a interface eletroquímica é caracterizada por possuir 5 regiões distintas (DUNWELL; YAN; XU, 2018; KHADEMI; BARZ, 2020), a saber:

- **O próprio eletrodo** – local onde a corrente e potencial elétrico são controlados;
- **Plano Interno de Helmholtz (PIH)** – localizado à nanômetros de distância do eletrodo, o PIH é marcado por apresentar espécies químicas especificamente adsorvidas à superfície do eletrodo, incluindo moléculas do solvente, produtos e intermediários de reações etc.;
- **Plano Externo de Helmholtz (PEH)** – local que possui a camada mais próxima de íons solvatados atraídos por forças eletrostáticas. Dessa forma, o PEH é compreendido como a camada com íons de carga oposta à do eletrodo;
- **Camada difusa** – posicionada após o PEH, consiste em camadas alternantes de cátions e ânions marcados por manterem a neutralidade da dupla camada;
- **Seio da solução** – localizado após a camada difusa, contém íons que não trabalharão diretamente nas reações eletroquímicas, não afetando, portanto, o potencial do eletrodo.

Tais camadas foram sendo delineadas com o tempo, onde são reconhecidas pelo menos 3 diferentes modelos de DCE.

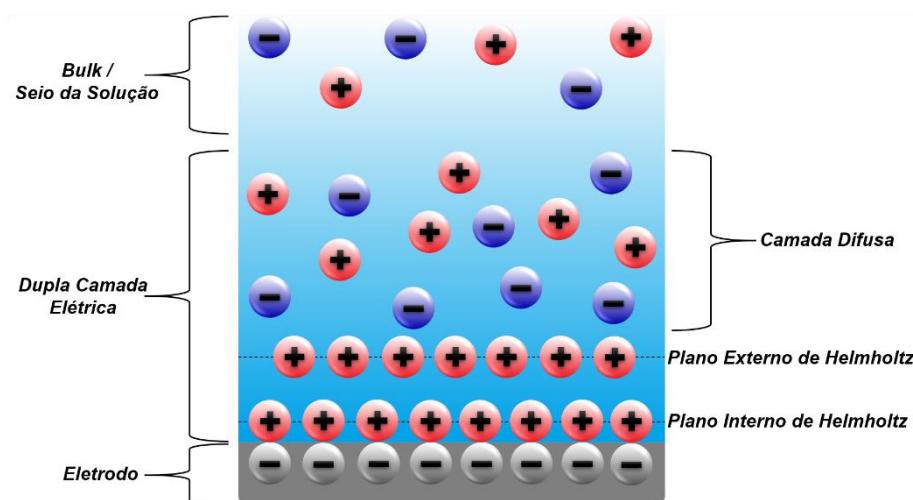


Figura 5 – Esquema demonstrando os componentes que dão origem a dupla camada elétrica na interface eletrodo-solução. Fonte: Próprio autor.

A primeira proposta se deu com Helmholtz em 1879 (HELMHOLTZ, 1879), estipulando que na interface de uma superfície carregada e um eletrólito existe uma camada de íons solvatados de carga oposta. No início dos anos 1900, Gouy e Chapman desenvolveram um outro modelo, determinando que as cargas são móveis, onde a concentrações de íons muda exponencialmente dentre o comprimento de Debye, considerado a espessura aproximada da DCE, em condições fisiológicas, como sendo de aproximadamente 1 nm (CHAPMAN, 1913; GOUY, 1910). Em adição, nesse modelo eles determinaram uma camada difusa de contra-íons (íons de carga oposta à superfície) e co-íons, que são repelidos por eles. Em 1924, Stern desenvolveu um modelo mais realista para descrever a situação física da interface (STERN, 1924). Ele basicamente uniu os modelos anteriores, adaptando a camada compacta de íons usada por Helmholtz e a camada difusa de Gouy-Chapman, prolongando ao seio da solução eletrolítica. Tal modelo é conhecido como Gouy-Chapman-Stern, como já demonstrado na Fig. 5.

Qualquer alteração na superfície do eletrodo utilizado em biossensores eletroquímicos resulta em perturbação das cargas presentes na interface eletrodo-solução, e assim, altera a DCE, o qual age como um capacitor. Dessa forma, todas informações acerca das alterações físico-químicas ocorrendo na interface em estudo podem ser obtidas em forma de sinal elétrico e avaliado por diferentes técnicas eletroquímicas.

2.3.2. Métodos de transdução eletroquímica

Os biossensores podem ser categorizados baseando-se no método de transdução empregado, sendo o transdutor um componente essencial em plataformas sensoras cujo objetivo compreende basicamente o processo de detecção do sinal. Técnicas eletroquímicas são ferramentas promissoras no desenvolvimento de biossensores através de estudos de processos de oxidação-redução, cinética e termodinâmica de transferência de elétrons (SCOTT, 2017).

A capacidade de detecção de um biossensor é permeada por diferentes variantes, tais como material e geometria do eletrodo, tipo de modificação/funcionalização de sua superfície, tipo de solução eletrolítica usado para a análise etc. (THEVENOT et al., 2014). A superfície funcional (eletrodo de trabalho) é habilitada para interagir especificamente com um analito-alvo, onde por meio de diferentes técnicas, tal interação é facilmente detectada e resulta em uma relação linear entre o sinal medido com a concentração do alvo em questão.

Os princípios de transdução eletroquímica se sobrepõem dentre as outras opções pelas características já citadas anteriormente, destacando a simplicidade, portabilidade, miniaturização e rápida obtenção de resposta. O evento da interação entre o elemento de biorreconhecimento como anticorpos e peptídeos com o analito alvo pode ser estudado, por exemplo, por meio da detecção de uma corrente (biossensores amperométricos/voltamétricos), potencial ou carga (biossensores potenciométricos), ou também pela variação da condutividade do meio (biossensores condutimétricos), sendo este último, um subconjunto de biossensores impedimétricos (SHARMA et al., 2019).

2.3.2.1. *Biossensores condutimétricos*

Tal classe de biossensores compreende o uso de dois eletrodos metálicos separados por uma distância fixa, presentes em uma solução eletrolítica onde o método mede a mudança da condutividade da solução que varia com a mudança de concentração das espécies iônicas. Em sua maioria, esses biossensores apresentam enzimas como moléculas de biorreconhecimento, assim, a técnica é capaz de

determinar a condutividade entre os dois eletrodos, onde em um houve a reação enzimática (PERUMAL; HASHIM, 2014). Dessa forma, a reação resultante ocasiona alterações nas espécies iônicas carregadas na solução. Essas “alterações” na condutância da solução são desencadeadas pela reação biocatalítica entre o analito-alvo presente na superfície do eletrodo e a enzima situada na solução (JAFFREZIC-RENAULT; DZYADEVYCH, 2008).

A abordagem condutimétrica vem caindo em desuso nos últimos anos devido a diversos parâmetros que afetam diretamente a análise do analito, como o pH do meio utilizado, o tipo de tampão e a força iônica, limitando, portanto, sua aplicabilidade. Por outro lado, tal transdução tem a vantagem de não utilizar outros eletrodos como o ER e CE, além de ser eficiente com a aplicação de uma pequena corrente alternada e apresentar fácil miniaturização. Apesar de alguns pormenores, ainda há interesse no desenvolvimento de imunossensores condutiméricos.

Como exemplo, pode-se destacar o sensor elaborado por Li e colaboradores (LI et al., 2018), onde nanoestruturas tais como nanofolhas de nitrato de carbono foram utilizadas para aumentar a área de superfície entre o analito (alfa-fetoproteína) e o anticorpo específico, cuja interação resultou em uma perturbação na condutividade do sensor. Com um limite de detecção de 0.097 ng mL, a estratégia criada se mostra uma excelente alternativa de detecção diante dos métodos tradicionais como o ELISA. Em uma perspectiva inovadora, Wonsawat e seu grupo (WONSAWAT et al., 2020) recentemente descreveram a detecção de *S. typhimurium* usando uma plataforma sensora montada em papel de filtro. A plataforma contendo anticorpos monoclonais de captura e nanopartículas de ouro conjugadas com o anticorpo de detecção foi capaz de detectar colorimétrica e condutimetricamente a bactéria em concentrações próximas a 10 UFC mL⁻¹, com um tempo de análise de pelo menos 30 minutos. Os resultados de ambos os exemplos são encorajadores, provando que a interpretação amperométrica está longe de entrar em desuso.

2.3.2.2. Biossensores amperométricos

Considera-se o termo “amperometria” como o processo de identificar variações na corrente através do tempo enquanto um potencial é mantido constante na célula

eletroquímica ou entre os eletrodos ET e ER, além de um terceiro eletrodo (CE) ser inserido ao sistema para auxiliar na medição do fluxo da corrente eletrônica. A transdução amperométrica é extremamente útil em sistemas biossensores quando se almeja medir a corrente resultante de uma interação do sensor com o analito alvo, bem como a oxidação e redução de espécies eletroativas em determinada reação (SLAUGHTER, 2018).

Uma vez que diversas moléculas sofrem reações de oxirredução em eletrodos de metais inertes (como o ouro), elétrons podem ser transferidos do analito para o eletrodo e vice-versa. Entretanto, a direção do fluxo de elétrons depende das propriedades físico-químicas do analito (bem como da plataforma sensora disposta à superfície do ET), o qual podem ser controladas pelo potencial elétrico aplicado ao ET. Portanto, se um potencial positivo é aplicado ao eletrodo, ocorre uma reação de oxidação (perda de elétrons) onde o fluxo de elétrons resultante é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas (plataforma, analitos etc.) adsorvidas no ET. Do mesmo modo, a aplicação de um potencial negativo sucede-se com uma reação de redução (ganho de elétrons) (PERUMAL; HASHIM, 2014).

A primeira plataforma a ser chamada “biossensora” utilizou a amperometria para análise de resultados, justamente com a invenção de Leland Clark, considerado o “pai dos biossensores”: o sensor para detecção de oxigênio (CLARK, 1956). O eletrodo de oxigênio (também conhecido como Eletrodo de Clark) é caracterizado por conter uma membrana de Teflon porosa e oxigênio-seletiva, um ET de platina (catodo, sendo o local onde o oxigênio é reduzido) e Ag/AgCl como ER. Esse sistema de dois eletrodos permitiu a redução do oxigênio no ET contra o ER para produzir uma corrente proporcional à concentração de oxigênio em um potencial fixo.

Um bom exemplo de biossensor amperométrico em amplo uso em todo mundo são os glicosímetros, biossensores que monitoram os níveis de glicose no sangue. O desenvolvimento desse biossensor décadas atrás permitiu o advento dessa área de pesquisa, onde com o aumento dos cuidados com saúde nos últimos anos, diversas empresas têm buscado novas alternativas de sensores para todo tipo de problemas relacionados à saúde, seja de origem humana quanto animal.

Diferentes estratégias sensoras usando amperometria como método de transdução foram criadas nos últimos anos. Em um exemplo recente, Hronceková e colaboradores criaram um biossensor amperométrico enzimático cuja plataforma sensora baseada em nanocompósito contendo quitosana e sarcosina oxidase como molécula de biorreconhecimento para a identificação da sarcosina, um potencial biomarcador do câncer de próstata (HRONCEKOVA et al., 2020). Com limite de detecção de 18 nM do biomarcador em amostras de urina, o biossensor se mostra promissora por estar dentro de níveis de relevância clínica, além de auxiliar métodos corriqueiros de diagnóstico de câncer prevalente em homens.

A identificação de microrganismos também é uma área crescente na análise amperométrica. Vásquez e sua equipe propuseram um biossensor amperométrico baseado na interação de anticorpos marcados por estreptavidina e biotina (VÁSQUEZ et al., 2017). O sensor foi capaz de detectar células de *Staphylococcus agalactiae* em pouco mais de 1 hora de análise, além de indicar limite de detecção de 10 UFC mL⁻¹. Importante ressaltar que, de modo similar a outras opções eletroquímicas, aqui também são utilizadas células de três eletrodos.

A amperometria oferece diversas opções de técnicas que podem ser exploradas na análise e desenvolvimento de biossensores. Por exemplo, podem-se destacar a cronoamperometria do tipo *single* e *double-step*, onde um ou dois pulsos de potenciais constantes são aplicados e o sinal obtido corresponde a variação da corrente em função do tempo (REZAEI; IRANNEJAD, 2019). Além destes, temos as voltametrias de pulso, caracterizados pela corrente ser visualizada no fim de cada pulso de potencial. Tal grupo de análises voltamétricas englobam as voltametrias de onda quadrada (VOQ), pulso reverso (VPR) e de pulso diferencial (VPD). Nessas opções, a corrente de dois pulsos consecutivos é reduzida, ação essa que dá origem a diminuição da corrente de fundo e com ela, um pico (PACHECO et al., 2013).

Sendo provavelmente os tipos mais empregados para sistemas de biorreconhecimento por permitirem uma investigação simples e qualitativa de estudos eletroquímicos, a voltametria de varredura linear (VVL) e a voltametria cíclica (VC) se baseiam na aplicação de um potencial que varia pelo tempo, cuja corrente resultante é plotada em função desse potencial. Como resultado, observa-se a obtenção de correntes de pico de tamanho proporcional à concentração do analito-alvo (ou da

reação bioquímica), onde na VVL se tem um pico único, enquanto a VC é destacada pela presença de dois picos: o pico anódico (relacionado à oxidação das espécies adsorvidas na superfície do eletrodo e varredura em direção a maiores potenciais) e pico catódico (redução, varredura direcionada a potenciais negativos) (SCHOLZ, 2015). Dessa forma, por ter sido utilizado nos estudos da presente tese, os principais aspectos da VC serão discutidos a seguir.

2.3.2.2.1. Voltametria cíclica (VC)

Biossensores voltamétricos são populares devido a sua versatilidade e simples análise, cuja variedade de parâmetros para análise como potencial (E), corrente (i), tempo (t) e carga (Q) podem ser analisadas, a depender da técnica e finalidade do sensor (DHANJAI et al., 2018).

Pertencendo a classe de transdução amperométrica, a VC é caracterizada com um gráfico geralmente apresentado em forma de “pato”, obtido pela variação do potencial e medição da corrente resultante, onde o ponto superior e inferior do “pato” refere-se às correntes de pico anódicas e catódicas, respectivamente, em um sistema eletroquímico de três eletrodos imersos em uma solução eletrolítica. Em adição, o voltamograma cíclico (como é conhecido o gráfico de VC) é obtido pela medição da corrente entre o ET e o CE em função do potencial (fornecido pelo ER, medido entre ele o ET) (ARISTOV; HABEKOST, 2015).

Para ficar claro o porquê de existirem “picos” em voltamogramas cíclicos, pode-se considerar o equilíbrio entre o ferroceno (Fc) e ferrocínio (Fc⁺). Tal equilíbrio pode ser facilmente acessado pela equação de Nernst (Equação 7), que descreve o potencial de uma célula eletroquímica (E) para o potencial padrão das espécies (E⁰) e a atividade da forma oxidada (Ox) e reduzida (Red) do analito presente no sistema em equilíbrio (ELGRISHI et al., 2018):

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(Ox)}{(Red)} = E^0 + 2.3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{(Ox)}{(Red)} \quad \text{Eq. 7}$$

onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura, n é o número de elétrons, R é a constante universal dos gases. Assim, a fim de que fique experimentalmente mais compreensível, a equação de Nernst pode ser aplicada para a redução de um elétron de Fc^+ para Fc (baseado em suas concentrações), o n é aplicado igual a um e o E^0 é trocado pelo potencial formal ($E^{0'}$) (frequentemente estimado em associação com o valor do potencial de meio pico [$E_{1/2}$] em um voltamograma), resultando na Equação 8:

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[Fc^+]}{[Fc]} = E^{0'} + 2.3026 \frac{RT}{n} \log_{10} \frac{[Fc^+]}{[Fc]} \quad \text{Eq. 8}$$

Tal equação fornece informações que predizem como determinado sistema eletroquímico irá responder diante de mudanças no potencial aplicado ao eletrodo ou até mesmo à concentração das espécies eletroativas envolvidas na reação. Portanto, se um potencial $E = E^{0'} \approx E_{1/2}$ é aplicado ao exemplo do Fc^+ em solução, a equação de Nernst prediz que o Fc^+ será reduzido para Fc até que haja equilíbrio, $[Fc^+] = [Fc]$. Direcionando tais pontos discutidos à experimentos envolvendo VC, é correto afirmar que a concentração das espécies eletroativas próximas ao ET muda em função do tempo de acordo com a equação de Nernst (ACHARYA, 2020).

Facilitando o entendimento, um clássico voltamograma cíclico foi criado e apresentado na Fig. 6. Como se pode observar, quando uma solução de Fc é “varrida” a potenciais mais positivos, ou “anodicamente” (de A a D), o Fc será oxidado a Fc^+ na superfície do ET. No ponto C temos a corrente de pico anódica (i_{PA}), caracterizada pela presença adicional de Fc vindo do seio da solução por difusão. Com isso, a superfície do ET contendo a forma oxidada (Fc^+) continua crescendo até atingir ponto de saturação, reduzindo o transporte de massa de Fc ao ET. Essa ação resulta na diminuição da i_{PA} durante a varredura (C $\rightarrow$ D). Deste ponto, quando o potencial de comutação (D) é alcançado, a varredura segue um caminho inverso, seguindo na direção de potenciais mais negativos (catódico). Essa ação resulta na redução de Fc^+ na superfície do ET, obtendo novamente Fc (de D a G) e a corrente de pico catódica (i_{PC}) no ponto F. Em adição, seguindo a equação de Nernst, o potencial $E = E_{1/2}$ nos pontos B e E, a concentração de Fc^+ e Fc na superfície do ET são iguais. A seção

entre C e F contém o valor de potencial que pode estimar o valor de E^0 para uma reação reversível como a obtida pela VC (ESPINOZA et al., 2019).

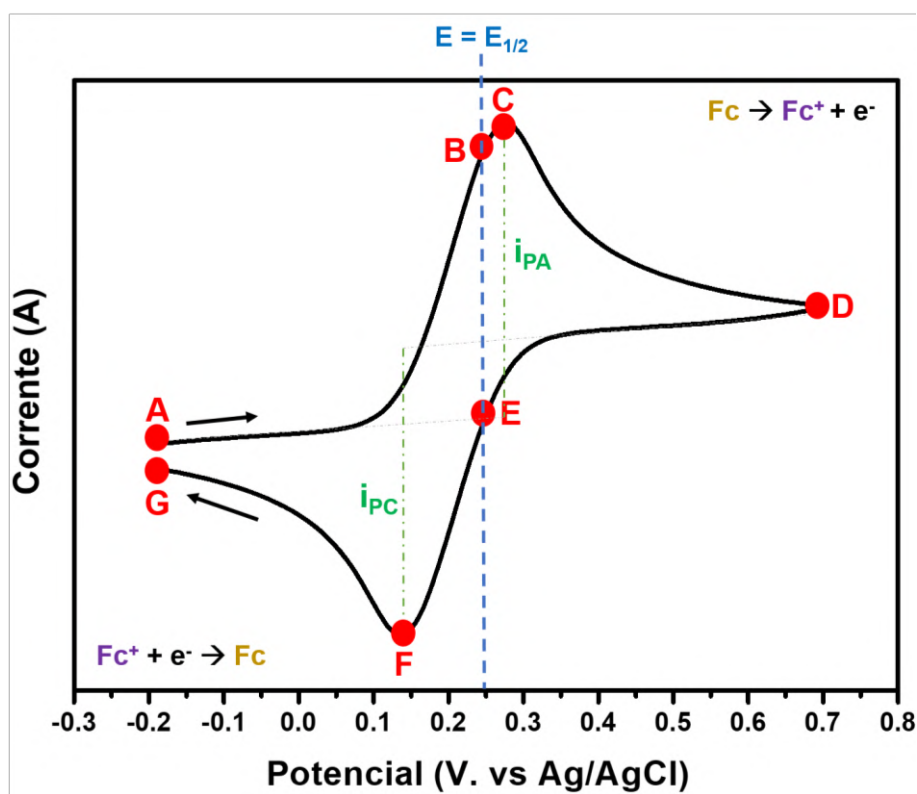


Figura 6 – Voltamograma cíclico demonstrando uma reação reversível na superfície de um eletrodo.
Fonte: Próprio autor.

Existem pelo menos três mecanismos diferentes de transferência de elétrons, a saber: processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis. Simplificando, reversibilidade química se refere a se o analito se apresenta estável sob redução e posterior oxidação. Já a reversibilidade eletroquímica é relacionada a cinética de transferência de elétrons ocorrendo entre o analito e o ET (ELGRISHI et al., 2018). À vista disso, para saber se certo experimento envolvendo VC é reversível, pode-se seguir três pontos:

- I. As correntes de pico (I_p) para reações progressivas e reversas são as mesmas, como destacado na Equação 9:

$$\frac{I_p(red)}{I_p(ox)} = 1 \quad \text{Eq. 9}$$

- II. A I_p (dada em ampère) aumenta linearmente com a raiz quadrada da taxa de varredura v ($V s^{-1}$), em que n é o número de elétrons transferidos na reação de oxidação-redução, A (cm^2) é a área de superfície do eletrodo (vista como área de superfície geométrica), D_o ($cm^2 s^{-1}$) é o coeficiente de difusão do analito oxidado, C^0 ($mol cm^{-3}$) é a concentração total do analito, R ($K^{-1} mol^{-1}$) é a constante universal dos gases e T (em Kelvin) é a temperatura, como segue na equação de Randles-Sevcik (Equação 10) (SUN et al., 2020):

$$i_p = 0.446nFAC^0 \left(\frac{nFvD_o}{RT} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. 10}$$

- III. Quando a diferença entre os potenciais de eletrodo em que ocorrem a redução (catódico) e oxidação (anódico) é constante em todas as taxas de varredura – também conhecida como separação pico-a-pico (ΔE_p) – e tem um valor de 59 mV entre si e os picos parecem ter a mesma altura entre si, significa que é um processo reversível de transferência de um elétron ($n = 1$), como visualizado na Equação 11:

$$\Delta E_p = E_p(anódico) - E_p(catódico) = 0.059 / n \quad \text{Eq. 11}$$

2.3.2.3. Biossensores potenciométricos

A potenciometria é considerada uma técnica analítica pioneira cujo uso permite a determinação de íons presentes em determinado meio sob ampla concentração. Basicamente, tal transdutor quantificará a aglomeração de carga na célula eletroquímica por meio de um ET íon-seletivo que irá interagir com íons específicos carregados, resultando no acúmulo de potencial de carga no ER, sendo esse potencial diretamente proporcional à concentração do analito em estudo (DING; QIN, 2020). A primeira aplicação desse transdutor ocorreu no final da década de 60 por meio de um biossensor enzimático para detecção de ureia (GUILBAULT; MONTALVO, 1969), e desde então, seu uso se expandiu para a identificação de diversos analitos.

A equação de Nernst fornece informações para distinguir os valores de potencial do ET e ER após interação com o analito-alvo, como observado na Equação 12:

$$E = E_0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(\frac{a_i^{amostra}}{a_i^{ref}} \right) \quad \text{Eq. 12}$$

onde E_0 é o potencial padrão do ET, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, Z_i é o nº de elétrons participantes da reação redox, F é a constante de Faraday, $a_i^{amostra}$ é a atividade dos íons na amostra e a_i^{ref} é a atividade iônica no ER. Três tipos de sensores potenciométricos se destacam pelo amplo uso, como os eletrodos íon-sensíveis (ISE) baseado em membranas (como exemplo, eletrodos de pH), eletrodos de fio revestido e transistores de efeito de campo íon-seletivos (FET) (ZDRACHEK; BAKKER, 2019).

Eletrodos do tipo ISE têm sido amplamente utilizados para a identificação de diferentes espécies iônicas em amostras clínicas com excelentes limites de detecção, fornecendo informações sobre a concentração iônica livre, onde outros métodos eletroquímicos indicam a concentração total (DING; QIN, 2020).

Um bom exemplo de dispositivo foi o criado por Jakhar e Pundir, utilizando um ISE específico para íons de amônia, visando a detecção de ureia em soro (JAKHAR; PUNDIR, 2018). Com uma plataforma contendo nanopartículas de urease em uma membrana de nitrocelulose, o biossensor potenciométrico enzimático foi capaz de detectar o analito-alvo na concentração de até 1 μM , ressaltando que o eletrodo funcionalizado pode ser reutilizado para até 9 análises diárias durante 6 meses. Tal característica qualifica essa alternativa de diagnóstico como economicamente viáveis.

Em uma criação recente proposta por Koike e colaboradores, um sensor do tipo FET para detecção de glicose demonstrou excelente sensibilidade, com limite de detecção de 0.001 mg mL do analito sendo detectado em uma plataforma caracterizada por uma membrana de fibroína de seda e dióxido de titânio e a enzima glicose oxidase como elemento de biorreconhecimento (KOIKE et al., 2020).

2.3.2.4. *Biossensores Impedimétricos: Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)*

Alguns estudos eletroquímicos envolvem a aplicação de corrente contínua (CC) e corrente alternada (AC), onde diferenças na análise podem ser encontradas. O fluxo de uma CC por um circuito elétrico bloqueado apenas por um elemento de resistência elétrica presente nesse circuito. Por outro lado, na aplicação de uma AC, além da resistência, outros meios impedem o fluxo de elétrons, como exemplo, um capacitor permite a que uma AC flua por processos de carga-descarga alternada. Dessa forma, a característica física que indica a oposição de uma corrente elétrica à passagem de uma AC quando um potencial alternado “V” é aplicado (BĂNICĂ, 2012).

A própria resistência elétrica pode ser considerada um exemplo de impedância elétrica. Dispositivos sensores que usam o monitoramento da variação da resistência são continuamente estudados usando materiais caracterizados por mudarem a resistividade elétrica após interação com o analito-alvo, como os sensores desenvolvidos pelo presente trabalho.

Como já citado, ao inserir um eletrodo na solução eletrolítica, há a imediata formação da DCE na interface eletrodo-solução, sendo a própria estrutura da DCE um tipo de capacitor, sendo este um outro caminho onde a corrente pode passar. As análises impedimétricas apresentam a vantagem de dar informações da resistividade do sistema e da DCE formada, onde a interação com determinado analito muda o comportamento de ambos.

Biossensores que utilizam a abordagem impedimétrica podem ser separados em duas classes de acordo com peculiaridades na superfície em análise e como as medidas serão realizadas: não-faradaicos/capacitivos e faradaicos. Sensores do tipo não-faradaicos são caracterizados por terem uma superfície coberta por uma camada dielétrica, e, portanto, se comporta como um isolante. Importante pontuar que esse tipo de sensor não requer o uso de uma solução eletrolítica, e a interação sensor-analito diminuem a capacitância de dupla camada (C_{DL}) (STEVENSON et al., 2018). Por outro lado, sistemas sensores faradaicos são identificados pela passagem da corrente ocorrendo em uma interface, onde a superfície de um eletrodo é revestida

por uma camada não-isolante que entra em contato com uma solução contendo substâncias com atividade redox, resultando em atividades de oxirredução.

De forma geral, a análise de sistemas sensores faradaicos são marcados pelas variações da resistência a transferência de carga (R_{CT}), onde a interação com o analito bloqueará a superfície sensora, resultando no aumento dos valores de R_{CT} (STRONG et al., 2021). Tanto a C_{DL} quanto a R_{CT} são elementos de um conhecido circuito elétrico que será explorado posteriormente. As análises impedimétricas realizadas pelo presente estudo ocorreram por processos faradaicos por justamente apresentar as características citadas acima.

A EIS analisa a impedância do sistema (Z) como a função da frequência de uma perturbação aplicada à célula eletroquímica, normalmente um potencial AC de pequena amplitude (5 a 10 mV), onde a resposta é uma corrente que difere o potencial aplicado em amplitude e fase. A lei de Ohm destaca que a corrente é a razão entre potencial aplicado (V) à resistência do condutor (R) (BĂNICĂ, 2012), como destacado na Equação 13:

$$I = \frac{V}{R} \quad \text{Eq. 13}$$

A Fig. 7 ilustra um trecho de AC de onda sinusoidal que pode ser caracterizado pela sua amplitude (V_m e I_m), frequência (f , em Hertz, estabelecido pela frequência angular $\omega = 2\pi f = 1/R_{CT}C_{DL}$) e o ângulo de fase (ϕ) obtido por um sinal referência a partir do potencial (V) aplicado.

Observa-se, portanto, que o exemplo de V e I apresenta diferentes amplitudes e frequências. O ϕ representa o caráter resistivo, capacitivo e indutivo de determinado sistema eletroquímico, onde características específicas de uma plataforma biossensora como o uso de nanopartículas metálicas ou moléculas de biorreconhecimento eletrocarregadas, por exemplo, resultarão em diferentes padrões de resposta da corrente AC (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020).

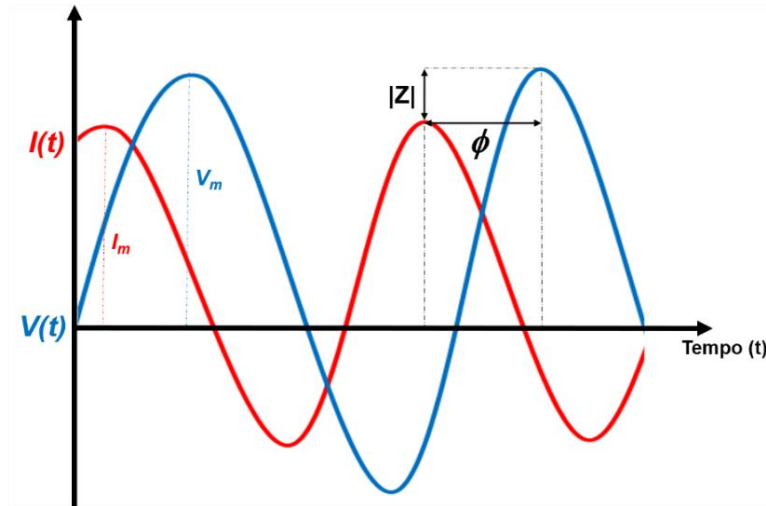


Figura 7 – Ilustração demonstrando a relação entre o potencial e a corrente. V_m e I_m : amplitude do potencial e corrente, respectivamente. Fonte: Próprio autor.

As Equações 14 e 15 descrevem o potencial (V^o) e corrente (I^o) aplicada em função do tempo (t) em diferentes amplitudes de oscilações da corrente (MUÑOZ; MONTES; BAEZA, 2017):

$$V(t) = V^o \text{seno}(\omega t) \quad \text{Eq. 14}$$

$$I(t) = I^o \text{seno}(\omega t - \phi) \quad \text{Eq. 15}$$

Uma vez discutido a relação potencial/corrente, a impedância de um sistema (Z) pode ser definida pela razão do potencial AC e corrente AC, em analogia com a Lei de Ohm, como expressado na Equação 16 (GROSSI; RICCÒ, 2017), onde $j = \sqrt{-1}$:

$$Z = \frac{V_{AC}}{I_{AC}} = |Z| \exp(j\phi) \quad \text{Eq. 16}$$

Tendo em mãos o módulo da impedância $|Z| = V^o/I^o$ e o ϕ , é possível expressar a Z em termos de números complexos através da fórmula de Euler (Equação 17), como pode-se observar na Equação 18:

$$e^{j\phi} = \cos(\phi) + j \text{seno}(\phi) \quad \text{Eq. 17}$$

$$Z = |Z|(\cos\phi + j \operatorname{seno} \phi) = Z_{re} + j Z_{im} \quad \text{Eq. 18}$$

Onde Z_{real} (Z') é a parte real e Z_{im} (Z'') é a parte imaginária da impedância, o qual pode ser facilmente expressa em um plano cartesiano, onde a impedância é representada por um vetor, como ilustrado na Fig. 8.

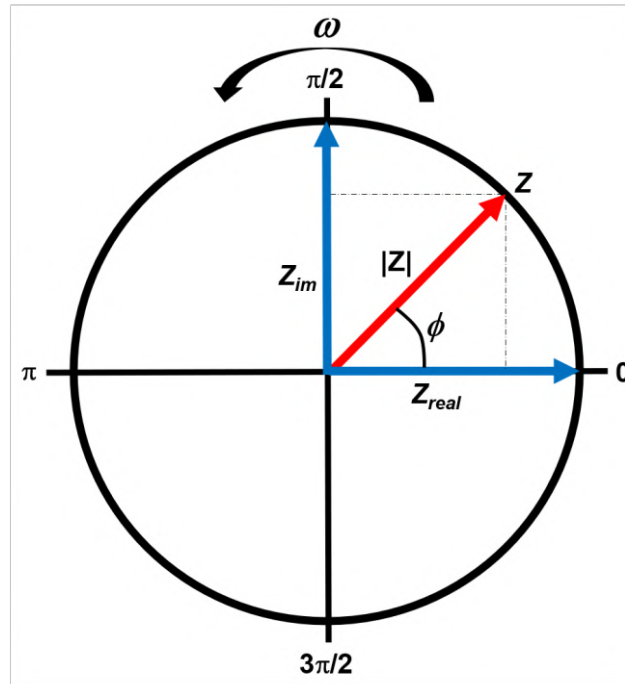


Figura 8 – Ilustração do vetor ou “fasor” (seta vermelha) da impedância mostrando seu componente real (Z_{real}) e imaginário (Z_{im}) (setas azuis). Fonte: Próprio autor.

Dessa forma, o valor absoluto (ou magnitude) da impedância também pode ser calculado seguindo a Equação 19:

$$|Z| = \sqrt{(Z_{re} + Z_{im})(Z_{re} - Z_{im})} = \sqrt{Z_{re}^2 + Z_{im}^2} \quad \text{Eq. 19}$$

Há diferentes modos de se observar a impedância de um sistema em gráfico. No caso de biossensores e cinética de transferência de elétrons o mais utilizado é o diagrama de Nyquist (Fig. 9a), de onde podemos obter dados de elementos de um circuito elétrico que frequentemente simulam o processo eletroquímico. Tal gráfico é representado pelo $|Z|$ vs. frequência a fim de se obter o espectro impedimétrico (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020). Outra opção é o diagrama de Bode (Fig. 9b),

representado pelo $\log|Z|$ ou $\log\phi$ vs. $\log\omega$, marcado por deixar o efeito da frequência mais evidente (SHARMA et al., 2019).

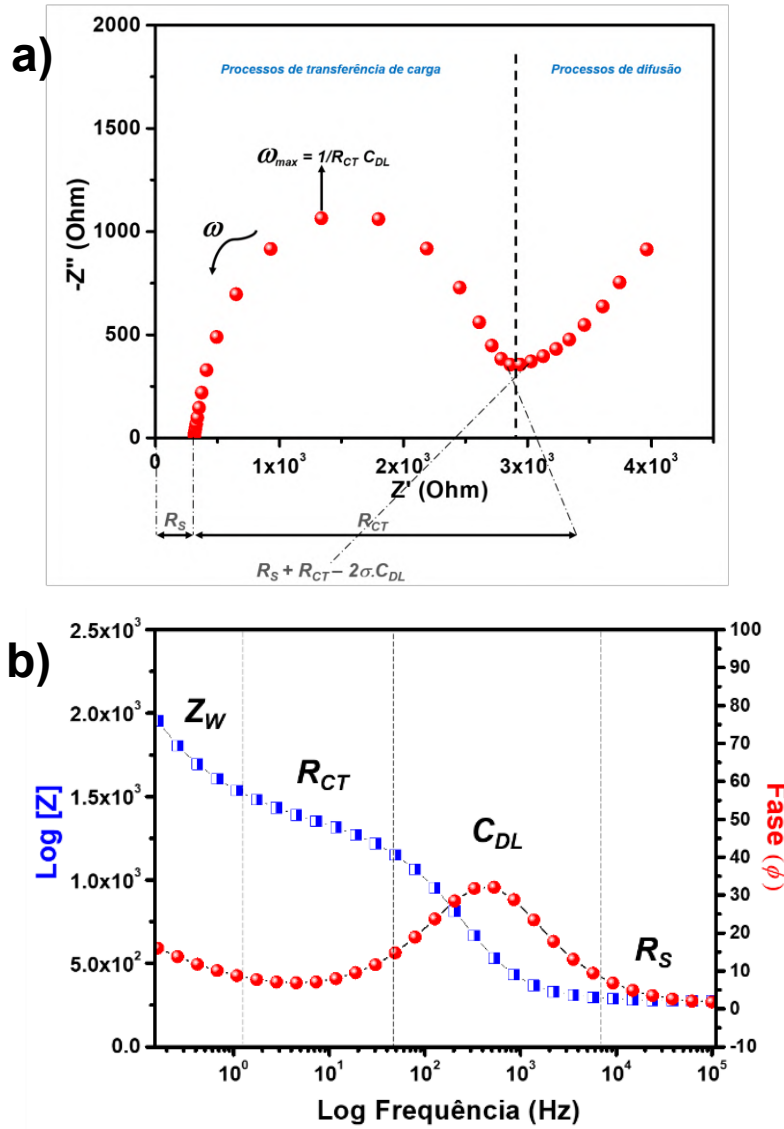


Figura 9 – Representação da EIS pelo diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode (b). R_S , R_{CT} , C_{DL} e Z_W são os elementos do circuito equivalente de Randles, o qual representam certas porções de cada diagrama. Fonte: Próprio autor.

Como citado anteriormente, os dados de EIS dos diagramas de Nyquist ou de Bode são frequentemente associados a um modelo de circuito elétrico teórico que simula o espectro impedimétrico, combinando elementos tais como resistores (representando um resistor que limita a passagem de elétrons caracterizado por ser um material adsorvido), capacitores (que indica o acúmulo de espécies eletricamente carregadas e indutores (que representa camadas passivas depositadas) (CHOI et al.,

2020). Uma vez estabelecido os métodos de análise impedimétrica, o comportamento da impedância de um sistema sensor durante a montagem da plataforma e nos eventos de biorreconhecimento são frequentemente interpretados pelo circuito equivalente de Randles (Fig. 10), caracterizado por possuir os seguintes elementos (CHOI et al., 2020; SANI, 2016):

- **Resistência da solução eletrolítica (R_s)** – dependente da concentração iônica, tipo de íons e área do eletrodo;
- **Resistência a transferência de carga (R_{CT})** – inversamente proporcional a taxa de transferência de elétrons, sendo este o parâmetro mais utilizado para medir a interação do biossensor com o analito alvo, onde tal evento retarda a cinética da transferência de elétrons na interface;
- **Capacitância de dupla camada (C_{DL})** – relacionada ao carregamento da DCE;
- **Elemento de fase constante (CPE)** – frequentemente aplicado no lugar da C_{DL} por interpretar a interface como uma camada compacta heterogênea;
- **Impedância de Warburg (Z_w)** – caracterizado por refletir, em baixas frequências, a influência do transporte de massa das espécies eletroativas na impedância total da célula eletroquímica.

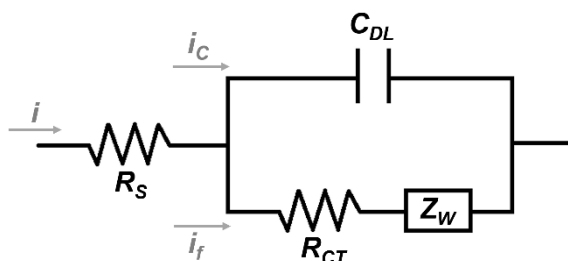


Figura 10 – Representação do circuito equivalente de Randles e a passagem da corrente capacitiva (i_c) e faradaica (i_f). Fonte: Próprio autor.

Resumidamente, como observado na Fig. 10, o circuito de Randles apresenta os elementos em paralelo por conta da corrente total que migra no ET, somando correntes do processo faradaico (i_f) e o carregamento da dupla camada (i_c). Pelo fato de a corrente elétrica passar através da resistência da solução, R_s é incluído como um elemento de série. R_s e Z_w representam as propriedades de massa da solução eletroquímica e difusão da sonda redox. Por outro lado, a C_{DL} e R_{CT} dependem das propriedades dielétricas e isolantes na interface eletrodo/solução (GROSSI; RICCÒ, 2017).

2.3.3. Microscopia de força atômica (AFM)

A avaliação da topografia de estruturas de origem sintética e biológica com resolução na escala nanométrica se tornou indispensável no campo diagnóstico a fim de determinar se determinada superfície está verdadeiramente revestida por elementos de uma plataforma biossensora. A introdução da AFM por Binnig, Quate e Gerber em 1986 auxilia não apenas no campo diagnóstico, pois apresenta aplicações na ciência de materiais, física, biologia molecular, dentre outros exemplos, podendo estudar as propriedades mecânicas, químicas, elétricas, magnéticas etc. em variadas superfícies e interfaces (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986).

Como demonstrado na Fig. 11, um aparelho de AFM é constituído basicamente por uma base geralmente constituída de cerâmicas piezoelétricas para posicionar a amostra, um suporte (cantiléver) onde uma sonda (também chamado de “ponta” ou “tip”) é acoplada e um detector fotodiodo. Assim, tal técnica detecta interações entre a sonda (também chamada de ponta do AFM) e as moléculas/átomos em uma superfície a partir de um feixe de *laser* que incide sobre o cantiléver, onde as interações sonda/amostra resultam na deflexão do cantiléver, desviando o feixe de laser incidente ao detector fotodiodo. Por fim, a varredura horizontal e vertical da superfície em estudo é processada em uma imagem topográfica tridimensional, sendo digitalizada por um software de computador (SHI et al., 2020).

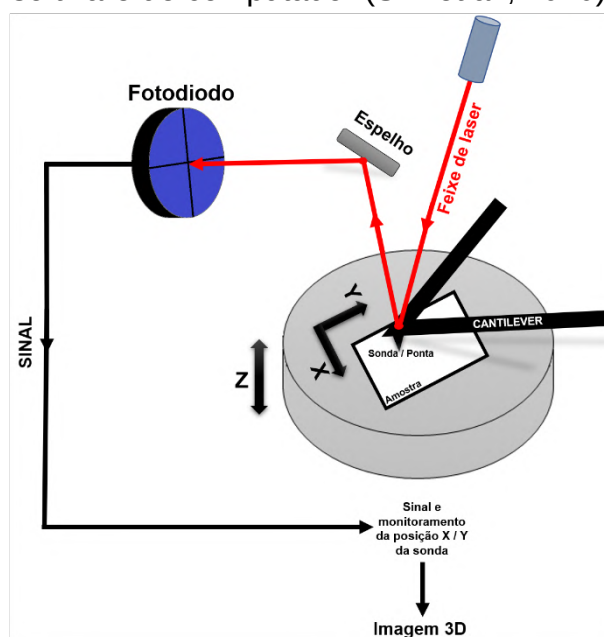


Figura 11 – Representação esquemática de um microscópio de força atômica e seus principais componentes. Fonte: Próprio autor.

Algumas forças repulsivas e atrativas agem diretamente na varredura de uma superfície funcionalizada, onde determinadas interações moleculares resultam no deslocamento da sonda, e por sua vez, do cantiléver. Como exemplo, pode-se citar interações eletrostáticas, atração de Van der Waals e repulsão de Pauli de curto alcance, o qual podem agir de isoladamente ou em conjunto (KREYSA; OTA; SAVINELL, 2014). Para fins práticos, a AFM apresenta pelo menos 3 modos de análise (Fig. 12) indicados para determinadas aplicações:

- **Modo contato** (também chamado modo não-oscilante/repulsivo) – a sonda não oscila e está em contato direto com a amostra, se movendo de forma que acomode adequadamente a superfície em leitura. Aplicado para avaliação de superfícies resistentes e sólidas;
- **Modo não-contato** – a sonda desliza a cerca de 100 Å da superfície em análise, onde o cantiléver oscila em sua frequência ressonante em pequena amplitude (± 10 nm), e por isso, forças atrativas são as mais atuantes. Muito utilizado na análise topográfica de semicondutores, polímeros e materiais biológicos;
- **Modo intermitente** – usa uma grande amplitude de oscilação (± 200 nm), onde a interação sonda-amostra se move em locais distantes e próximos da superfície avaliada, indicando, dessa forma, a presença de forças repulsivas e atrativas. Indicado para análise de polímeros hidrofílicos e materiais biológicos.

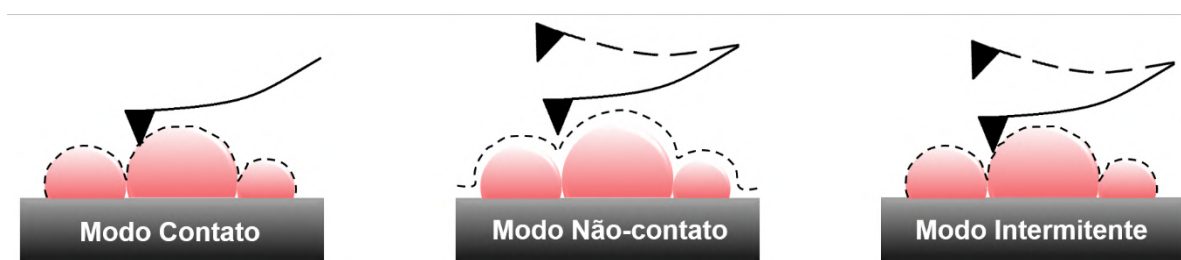


Figura 12 – Modos de operação de um microscópio de força atômica. Fonte: Próprio autor.

Uma vez que o cantiléver sofre deflexões na interação sonda/amostra, um sistema massa-mola pode ser considerado seguindo a lei de Hooke: $F = -k.x$, onde x é a deflexão do cantiléver e k a constante elástica (ZHANG et al., 2020). Tal constante pode ser descrita com parâmetros geométricos de acordo com a Equação 20:

$$k = \frac{E.l.e}{4.c} \quad \text{Eq. 20}$$

Onde E é o módulo de Young (para cantiléver de silício, $E = 1,3 \times 10^{11} \text{ N/m}^2$), e, l e c são a espessura, largura e comprimento do cantiléver, respectivamente. Para um cantiléver retangular em sistema vibrante massa-mola, a frequência ressonante pode ser calculada conforme a Equação 21:

$$f_{res} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad \text{Eq. 21}$$

Onde k é a constante elástica e m é a massa do cantiléver, expressa como $m = \rho.e.l.c$, sendo ρ a densidade do material utilizado (STEFFENS et al., 2012). Tais parâmetros devem ser regulados no equipamento a fim de resultar em uma boa imagem tridimensional da amostra com excelente resolução.

2.3.4. Montagem de plataformas biossensoras eletroquímicas

A identificação de diversos alvos terapêuticos causadores ou indicadores de doenças são essenciais na promoção da qualidade de vida da população, onde a área médica e alimentar desempenham um papel crucial. Com o avanço da ciência e tecnologia, múltiplos métodos têm sido desenvolvidos, dentre eles, os biossensores, trazendo uma nova opção diagnóstica.

Como destacado, a simples estrutura de um biossensor consistindo em um elemento de biorreconhecimento (ou biorreceptor) que reconhece determinada (bio)molécula alvo e um transdutor com o papel de converter a interação sensor-alvo em um sinal mensurável, sendo amplificado e posteriormente analisado. Dessa forma, visando uma interação mais sensível e específica com determinado alvo, uma vasta gama de biorreceptores podem ser exploradas.

Mas antes que o biorreceptor seja ligado à uma superfície (como a de um eletrodo), ela precisa passar por uma funcionalização que permita não apenas uma imobilização adequada de tal biorreceptor, mas também a ligação de nanoestruturas

que auxiliem (e amplifiquem) o sinal elétrico, melhorando diretamente na sensibilidade do sistema sensor em questão. Dessa forma, a escolha do método de funcionalização e de itens químicos e biológicos que irão compor uma plataforma biossensora depende do substrato (ou superfície) de montagem, onde no caso de biossensores eletroquímicos, em sua maioria, se trata de eletrodos com superfície de ouro (SANDHYARANI, 2019). Tais estratégias de modificação de superfícies voltadas para análise sensora serão destacadas a seguir.

2.3.4.1. Estratégias de funcionalização de superfícies sensoras

Após a escolha da superfície a ser preparada para uma atividade de biodeteção envolvendo biossensores, a primeira etapa de funcionalização, se dá, geralmente, pela formação de monocamadas automontadas (MAM) e/ou pela eletrodeposição de nanomateriais ou eletropolimerização de polímeros condutores.

2.3.4.1.1. Monocamadas automontadas

A praticidade do preparo e uso de MAM tornou-a uma ferramenta extremamente útil na construção de biossensores por formar filmes de compostos químicos em uma ampla variedade de substratos. A versatilidade na montagem de tais moléculas em superfícies como metais, vidros, polímeros etc. nos permite usar diversas biomoléculas. Os grupos funcionais presentes em sua estrutura são de vital importância, uma vez que algumas superfícies apresentam maior afinidade para determinado composto, onde muitas vezes faz-se necessário um tratamento inicial do substrato para promover a criação da MAM de maneira eficiente e reprodutível (SINGH; KAUR; COMINI, 2020).

Alguns estudos reportando o uso de MAM para diversas finalidades destacam a criação de MAM de silanos como o aminopropiltriétoxissilano (APTES) em superfícies de vidro e superfícies flexíveis de polímeros sintéticos como o óxido de índio dopado com estanho (ITO) (KHAN, 2016) e MAM de alcanotóis em metais nobres, como o ouro (GOTHE; GAUR; ACHANTA, 2018).

O ouro é um substrato considerado de primeira escolha devido a propriedades únicas, não vistas em outras superfícies metálicas. Por exemplo, o ouro não é oxidado pelo oxigênio, fornecendo uma superfície inerte e apresenta elevada biocompatibilidade, favorecendo a formação de filmes finos onde nanopartículas e biomoléculas podem se ancorar e podem ser analisadas por técnicas eletroquímicas como a VC e EIS (RAYMUNDO-PEREIRA et al., 2021). Ou seja, relacionando a biossensores, a MAM criada no ouro serve como uma ponte ordenada que liga a molécula de biorreconhecimento e a superfície de ouro do eletrodo.

Como representado na Fig. 13, é bem estabelecido que o ouro tem elevada afinidade por moléculas contendo enxofre (S) em sua estrutura, onde a superfície do metal pode ser modificada pela adsorção de compostos organosulfurados tais como os tióis (SH-R-X), sendo o X o grupo terminal do composto, como grupos carboxílicos, aminas etc. determinando, portanto, as propriedades funcionais da superfície modificada (SINGH; KAUR; COMINI, 2020).

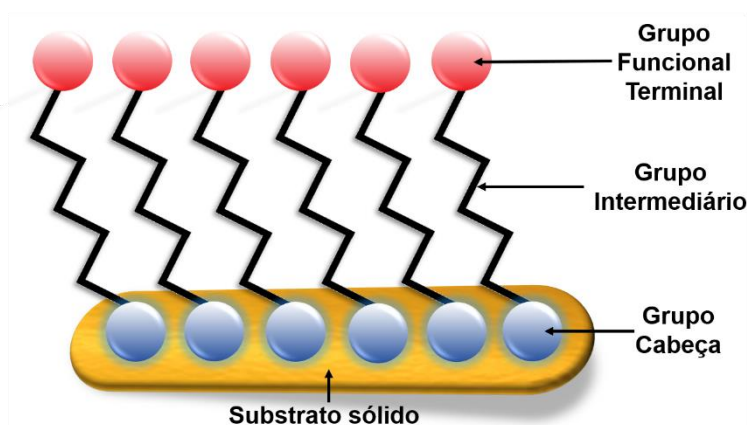


Figura 13 – Estrutura de uma monocamada automontada. Fonte: Próprio autor.

O processo de quimissorção que envolve a ligação do -SH ao ouro pela eliminação redutiva do hidrogênio pode ser visualizada pela Equação 22 (HASAN; PANDEY, 2018):

:



Diferentes forças agem na MAM formada, onde além da ligação química Au-S, também são observadas interações de van der Waals laterais entre as cadeias alifáticas das moléculas tioladas vizinhas. Tal característica permite que essas

moléculas se arranjam verticalmente, com um deslocamento de aproximadamente 30 graus (Fig. X). Em adição, os grupos terminais podem se atrair entre si, processo esse resultante da atração de van der Waals ou ligações de hidrogênio que podem existir entre os grupos funcionais presentes (SANDHYARANI, 2019).

2.3.4.1.2. Nanopartículas e nanomateriais

Nanomateriais têm sido amplamente explorados no desenvolvimento de biossensores, com destaque a nanopartículas metálicas e de materiais baseados em carbono devido a diversas características como biocompatibilidade, excelente condutividade e elevada área de superfície, além da simples e rápida síntese (ISLAM et al., 2020b). Alguns dos exemplos mais utilizados em plataformas biossensoras eletroquímicas são as nanopartículas de ouro (AuNPs), de prata (AgNPs), magnéticas (Fe_3O_4), óxido de grafeno (GO), nanotubos de carbono de parede única ou múltiplas (SWCNT e MWCNTs, respectivamente), dentre outros exemplos (MADURAVEERAN; JIN, 2017).

De forma a aprimorar a resposta eletroquímica de algumas plataformas biossensoras, o uso dessas nanopartículas promove uma rápida movimentação de íons carregados entre o eletrodo e o analito-alvo, favorecendo o processo de oxidação/redução, e com isso, aumenta a sensibilidade do sensor amplificando o sinal obtido (PUROHIT et al., 2020). AuNPs (também chamada de ouro coloidal) se destaca na área biomédica devido a diferentes aplicações, mérito este obtido pela sua fácil síntese, onde os métodos de preparo são rápidos e efetivos, resultando em nanopartículas em diferentes formas e tamanhos, o qual a olho nu, apresentam cores diversas (SAKELLARI; HONDOW; GARDINER, 2020). As AuNPs esféricas são as mais utilizadas, onde após a síntese, resultam em partículas de ~20 nm de cor avermelhada (SUCHOMEL et al., 2018).

O método mais tradicional de síntese de AuNPs é o desenvolvido por Turkevich e colaboradores, sendo posteriormente otimizado por Frens (FRENS, 1973; TURKEVICH; COOPER; HILLIER, 1951), caracterizado pela redução do Au(III) a íons Au(0) aquecendo até ebulição um sal de ouro como o ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) e adicionando um agente redutor como o citrato (Fig. 14). Com o passar das décadas,

novas e inovadoras metodologias de síntese foram elaboradas, como AuNPs “ocas” (SUN; MAYERS; XIA, 2003), AuNPs cúbicas pela redução fotoquímica (KUNDU et al., 2007), redes de ouro em 2D pela técnica de evaporação do solvente (PYRPASSOPOULOS et al., 2007), etc.

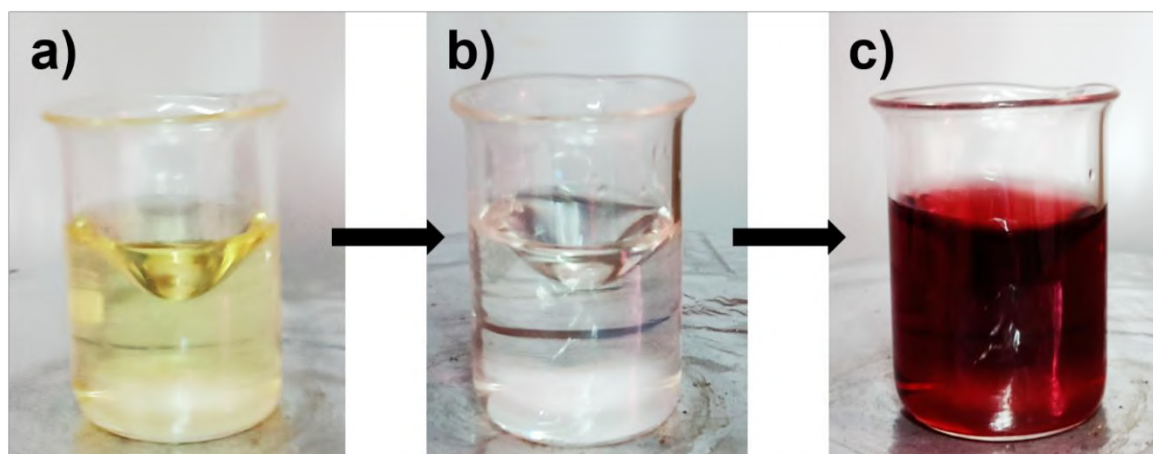


Figura 14 – Etapas da produção de AuNPs pelo método de Frens e Turkevich: a) solução de HAuCl_4 , b) adição do citrato de sódio à solução HAuCl_4 , resultando na mudança de cor pelo processo de redução, c) AuNPs. Fonte: Próprio autor.

Nanopartículas de óxido de ferro como a Fe_3O_4 é reconhecida como um material de elevada área de superfície ativa e acessível para a ancoragem de biomoléculas na construção de biossensores, onde também foi reportado que o recobrimento dessa classe de nanomateriais por outras nanopartículas como o ouro contribuem positivamente na obtenção de uma resposta eletroquímica aprimorada (MADURAVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018a).

Hasanzadeh et al., 2015 ressaltam a aplicabilidade dessas partículas magnéticas como elementos de amplificação de sinal para biossensores eletroquímicos, onde polímeros naturais ou sintéticos como a quitosana e álcool polivinílico podem revesti-las e assim permitir que biorreceptores como peptídeos, anticorpos, fragmentos de oligonucleotídeos possam funcionalizar tal superfície para interação com um determinado analito-alvo.

Uma das mais utilizadas formas de síntese de Fe_3O_4 se trata da co-precipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (Fig. 15) em meio alcalino via adição de uma base como o hidróxido de amônio (NH_4OH) (SCHWAMINGER; SYHR; BERENSMEIER, 2020).

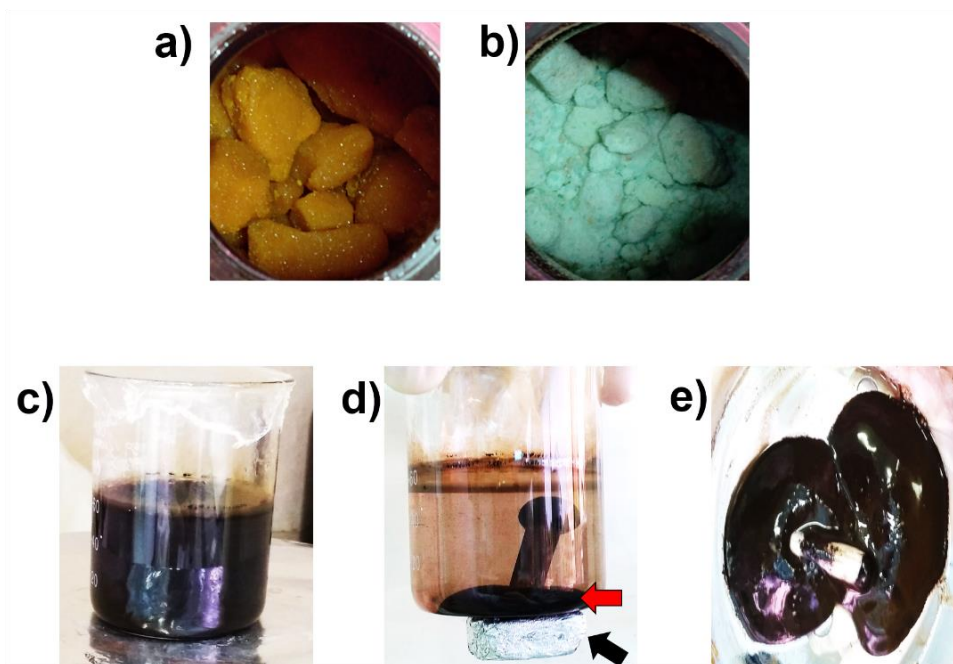
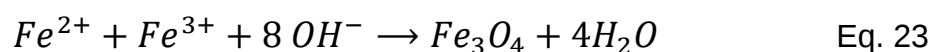


Figura 15 – Etapas da produção de Fe_3O_4 pelo método da co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} . a) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, b) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, c) síntese da Fe_3O_4 , obtida após a adição da base NH_4OH , d) Fe_3O_4 (seta vermelha) sendo “pescadas” por um ímã (seta preta), e) Fe_3O_4 . Fonte: Próprio autor.

Em adição, tal método de obtenção de Fe_3O_4 pode ser simplificado conforme descrito pela Equação 23 (EBRAHIMINEZHAD et al., 2012a):



Polímeros condutores são constituídos como uma importante classe de materiais orgânicos, onde suas características físico-químicas e elétricas também a elevam a promissor elemento utilizado não apenas no desenvolvimento de biossensores, mas também no uso de supercapacitores, baterias, células solares, dentre outras aplicações. Associado a essas características, a simples síntese e estrutura que permite a imobilização de moléculas de biorreconhecimento e aprimora a condução da corrente de elétrons, tornaram tais polímeros como a polianilina (Pani) e polipirrol (Ppy) um excelente aditivo em uma plataforma biossensora (GHORBANI ZAMANI et al., 2019).

Para a funcionalização da superfície de um eletrodo de trabalho com os citados polímeros ou nanopartículas, diferentes opções de síntese podem ser exploradas, com destaque à eletropolimerização. Tal processo pode ser visualizado na Fig. 16, onde em um eletrodo com superfície de ouro (Fig. 16a) e carbono vítreo (Fig. 16b) foram eletropolimerizados a Ppy (Fig. 16c) e Pani (Fig. 16d). Na Fig. 16e observa-se ouro eletrodepositado no eletrodo. Pela praticidade do método, rapidez e maior controle da espessura do filme polimérico, a eletropolimerização se torna uma opção frequente por obter nanoestruturas padronizadas com excelente reprodutibilidade (ABU-THABIT, 2016; CHU et al., 2020).

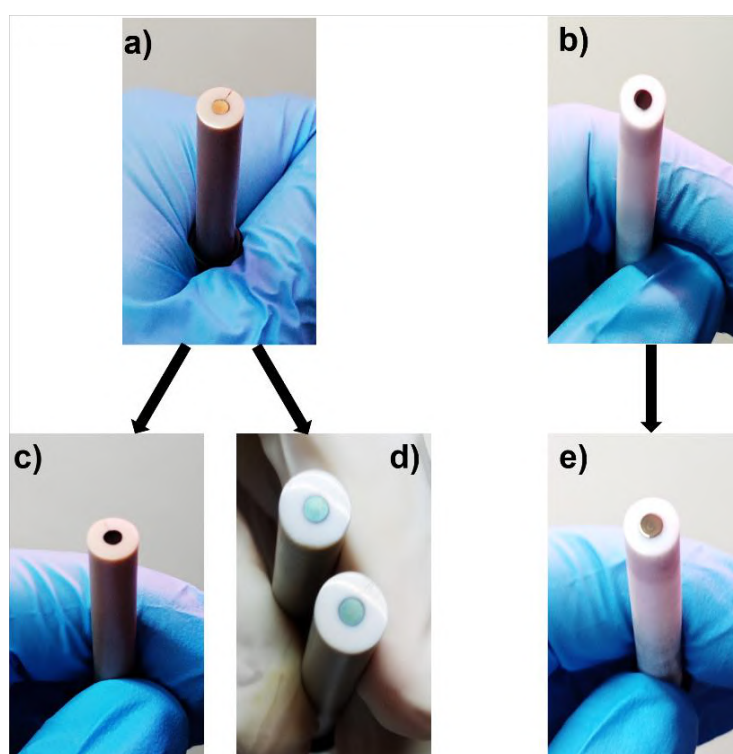


Figura 16 – Eletrodo com superfície de ouro (a) e de carbono vítreo (b) antes e após o processo de eletropolimerização do Ppy (c), Pani (d) e eletrodeposição de ouro (e). Fonte: Próprio autor.

Uma vez acertada a superfície e nanomateriais que comporão determinada plataforma biossensora, a escolha do elemento de biorreconhecimento é o que apontará a efetividade na detecção de um analito-alvo. Mas antes de designá-lo à interação com o analito, tal elemento precisará estar alocado na superfície do eletrodo ou substrato de montagem do sistema sensor, ou como em muitos casos, revestindo os nanomateriais que provavelmente incorporarão o sistema.

2.3.4.1.3. Imobilização de biorreceptores em superfícies

Diferentes estratégias de conjugação desses biorreceptores podem ser exploradas, onde a escolha do método depende da biomolécula a ser imobilizada, a natureza da superfície onde elas serão ligadas e o método de transdução para análise da interação analito-sensor. Em adição, características como orientação adequada na superfície de escolha, preservação das funções e atividades das biomoléculas e reprodutibilidade do método são requeridas na engenharia de superfícies sensoras (SANDHYARANI, 2019). A Fig. 17 destaca algumas das opções de funcionalizações de superfícies, usando como exemplo de biorreceptores, os peptídeos.

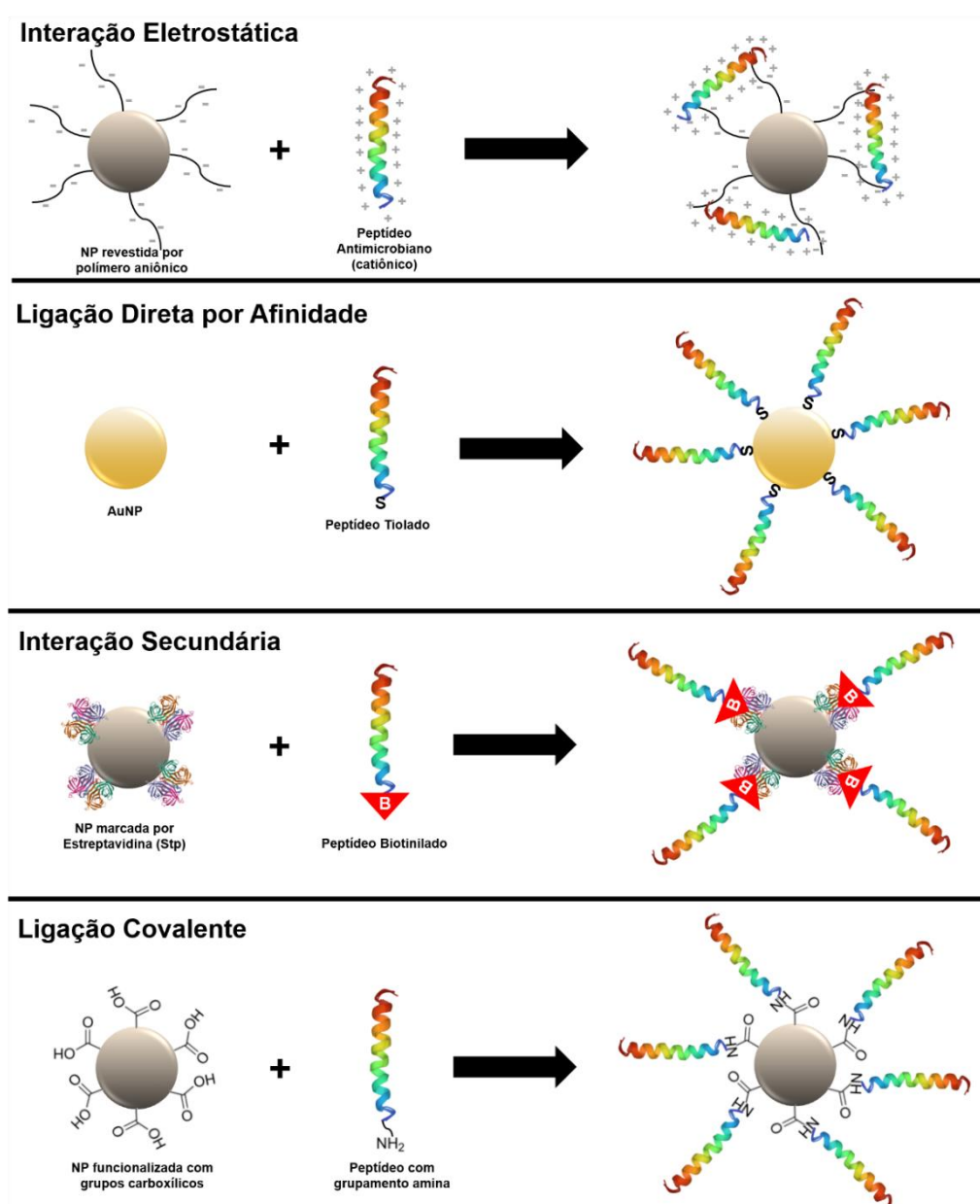


Figura 17 – Diferentes métodos de funcionalização da superfície de nanopartículas. Fonte: Próprio autor.

Basicamente, pode-se dividir tais estratégias em dois grupos: interação covalente (como reações de acoplamento amida via EDC-NHS, reticulação etc.) e interação não-covalente (interação eletrostática, empilhamento pi etc.), onde o método mais simples é a fisissorção, onde o biorreceptor se adsorve à superfície do nanomaterial por forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (PUROHIT et al., 2020). A escolha do elemento de biorreconhecimento, por fim, depende da aplicabilidade na identificação de determinado analito-alvo. A pesquisa no campo de biossensores está em crescimento não apenas por conta de vantagens como simplicidade na montagem, baixo custo e miniaturização (permitindo chegar a locais de difícil acesso), mas também pela ampla variedade de opções de biorreceptores que podem ser utilizados para um mesmo analito.

Pode-se destacar anticorpos, resultando na formação de um imunocomplexo antígeno-anticorpo; fragmentos de DNA/RNA ou oligonucleotídeos, onde sondas específicas podem ser utilizadas para identificar uma sequência-alvo, resultando na hibridização que desencadearia um sinal; aptâmeros, oligonucleotídeos sintéticos que podem ser desenhados para reconhecer inúmeros analitos e peptídeos, blocos reconhecidos pela versatilidade em interações biomoleculares (MADURAIVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018b; PUIU; BALA, 2019; SANDHYARANI, 2019). A Fig. 18 mostra algumas dessas alternativas promissoras de identificação de analitos, como microrganismos. A seção a seguir dará destaque aos peptídeos e lectinas como biorreceptores na identificação de microrganismos.

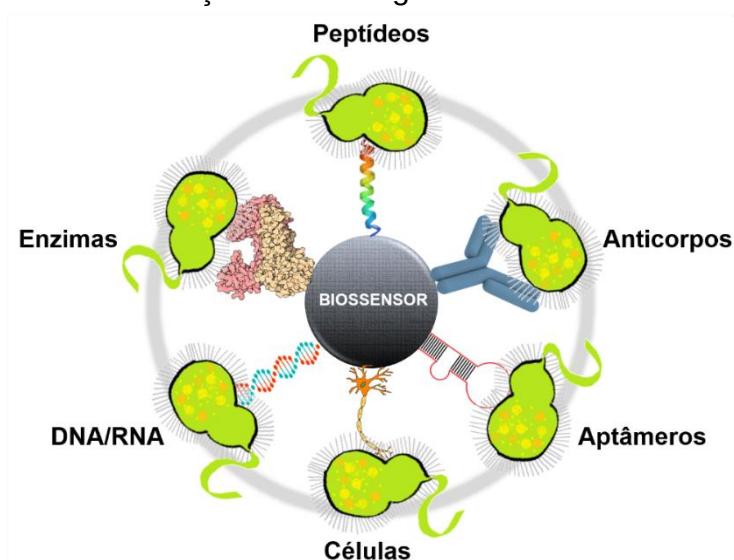


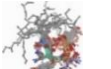
Figura 18 – Diferentes estratégias de elementos de biorreconhecimento usados em biossensores aplicados para a detecção de microrganismos. Fonte: Próprio autor.

2.3.4.1.4. Peptídeos antimicrobianos

Inicialmente empregado como solução no enfrentamento do problema da resistência de microrganismos a diversos antibióticos e antifúngicos, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) se tornaram uma alternativa inovadora de biorreceptor para plataformas biossensoras. Inúmeras pesquisas reportaram a eficiência dessas biomoléculas em identificarem alvos como bactérias e fungos (DE MIRANDA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2021; SILVA JUNIOR et al., 2018).

De modo geral, peptídeos são biomoléculas de estrutura que consiste em uma sequência de resíduos de aminoácidos. Os AMPs são peptídeos de sequências curtas de aminoácidos (~6 a 50 resíduos), e apresentam, em sua maioria, cargas positivas de superfície, estando presentes em várias formas de vida como parte integral de seu sistema imune inato (MORAVEJ et al., 2018). Uma pesquisa realizada na década de 1930 reportou o primeiro AMP, o qual foi isolado da bactéria *B. subtilis* em amostras de solo, e percebeu-se que oferecia proteção de infecção por pneumococos em camundongos. Tal AMP ganhou o nome de gramicidina, sendo reconhecido como o primeiro AMP identificado (DUBOS, 1939). Com o passar dos anos, inúmeros AMPs foram isolados em organismos de vários reinos, como destacado na Tabela 2.

Tabela 2 – Peptídeos antimicrobianos e seres vivos de onde são isolados. As imagens dos peptídeos foram obtidas pelo PDB (*Protein Bank Data*).

Marinhos	Clavanina A 	Pleurocidina 	Pardaxina 
Insetos	Synoeca-MP 	Cecropina A 	Drosomicina 
Anfíbios	Temporinas 	Magainina 	Ranateurina 
Plantas	Ciclotida 	Viscotoxina 	Hordotionina 
Microrganismos	Bacilolisina 	Bacilomicina 	Gramicidina 
Mamíferos	Lactoferricina 	Indolicidina 	Protegrina 

Apesar da variedade, todos os AMPs apresentam algumas propriedades similares entre si, como natureza anfifílica e afinidade por membranas eletronegativamente carregadas de microrganismos, principalmente de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GONG et al., 2020). Apesar de inúmeros estudos, o mecanismo de ação dos AMPs ainda não é totalmente elucidado, entretanto, alguns modelos já são aceitos, com destaque para a formação de poro modelo de barril, poro toroidal e modelo carpete (LI et al., 2017). Os modelos e etapas da interação AMP-bactéria podem ser visualizados na Fig. 19.

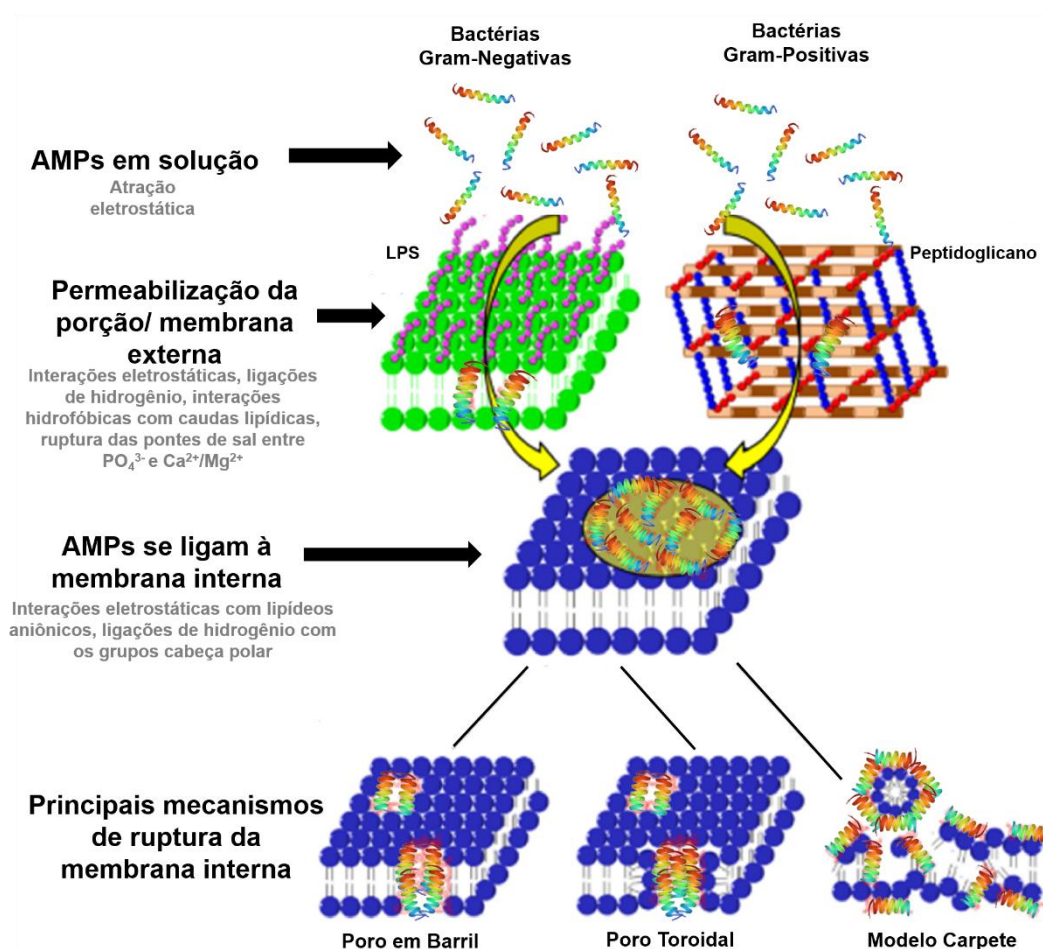


Figura 19 – Representação esquemática dos eventos moleculares da interação dos AMPs com bactérias e principais mecanismos de ação da ruptura da parede celular microbiana. Fonte: Adaptado de LEI et al., 2019.

Basicamente, a interação inicial de um AMP com uma bactéria ocorre via interação eletrostática, se atraindo de modo diferente para Gram-negativos e Gram-positivos. Os AMPs se atraem aos grupamentos fosfato aniônicos presentes no LPS de bactérias Gram-negativas como a *E. coli* e *K. pneumoniae*, e para Gram-positivas

como *S. aureus* e *B. subtilis*, atraindo os AMPs pelo ácido teicóico (LTA) também aniônicos presentes em sua parede celular (GONG et al., 2020).

Levando em conta a orientação dos peptídeos após interação inicial com o microrganismo, a primeira etapa prediz que o AMP adota uma posição paralela à bicamada lipídica, onde após o aumento da razão peptídeo-lipídeo, o AMP se aloca perpendicularmente à membrana, dando início ao processo de inserção (QIAO et al., 2020).

É estabelecido que os AMPs apresentam pelo menos 4 estilos estruturais secundários (Fig. 20), a saber: α -hélice, folha- β , forma estendida e mista, sendo as formas α -hélice e folha- β as mais abundantes na natureza (SEYFI et al., 2020).

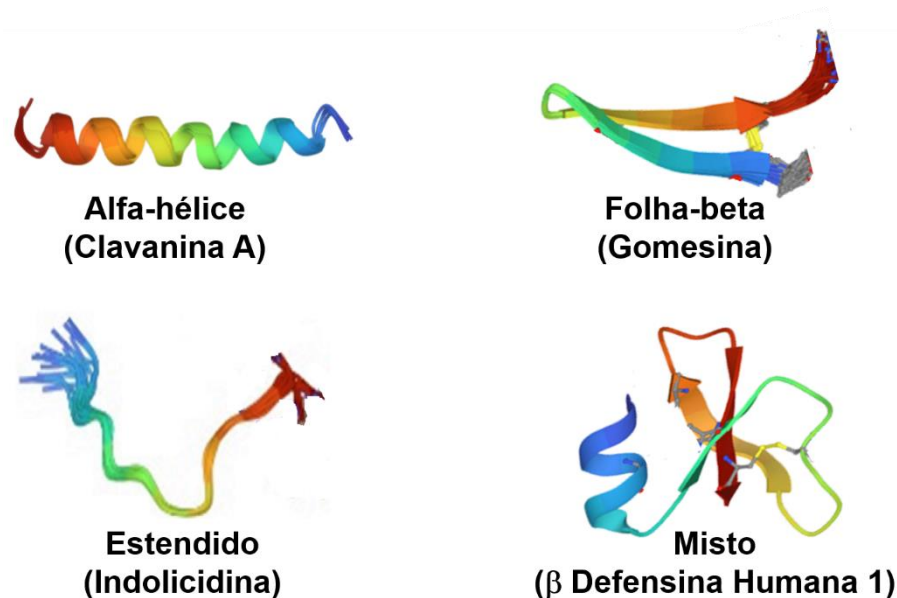


Figura 20 – Formas estruturais dos AMPs. Fonte: PDB.

A clavanina A (ClavA), synoeca-MP (Syno-MP) e a temporina-PTA (T-PTA) são alguns exemplos de AMPs encontrados na natureza e que podem ser utilizados como biorreceptores em plataformas biossensoras. Uma característica similar que os três peptídeos citados apresentam é uma forma indefinida em solução e estrutura secundária em α -hélice quando o processo de interação com um microrganismo é iniciado (DUAY et al., 2019; FREIRE et al., 2019; ROMERO et al., 2020).

Cada um deles exibe uma sequência de resíduos de aminoácidos singular, como observado na Fig. 21, que também destaca o ser vivo de onde foram isolados.

Clavanina A VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-NH ₂	Synoeca-MP INWLKLGKKIIASL-NH ₂	Temporina-PTA FFGSVLKLIPKIL-NH ₂
		
 <i>Styela clava</i> (tunicado marinho)	 <i>Synoeca surinama</i> (vespa social)	 <i>Hylarana picturata</i> (rã de florestas da Malásia)

Figura 21 – Nome, sequência dos resíduos de aminoácidos, forma estrutural e fonte dos AMPs utilizados no trabalho na construção de plataformas biossensoras. Fonte: Peptídeos: PDB; seres vivos: Google imagens.

Diferentes trabalhos destacaram a efetividade dos AMPs reconhecendo e diferenciando uma série de microrganismos. Por exemplo, a plataforma sensora desenvolvida por ANDRADE et al., 2015 composta por MWCNTs e o AMP ClavA identificou *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *B. subtilis* alcançando um limite de detecção de 10^2 UFC mL⁻¹. Outro trabalho envolvendo o uso do mesmo peptídeo foi o reportado por SILVA JUNIOR et al., 2018, onde a ClavA ancorada a AuNPs carboxiladas seis diferentes espécies de bactérias, entre Gram-positivas e Gram-negativas, entretanto, com maior sensibilidade por ter detectado na concentração de 10^1 UFC mL⁻¹.

Outro sensor desenvolvido recentemente foi o que ISLAM et al., 2020 propôs, onde uma plataforma composta por SAMs de ácido mercaptohexadecanóico e o AMP warnericina RK detectou a bactéria *Leginella pneumophila* em até 10^3 CFU mL⁻¹. Esses são apenas menções das diversas presentes na literatura, ressaltando, portanto, a efetividade do uso de tal biomolécula como elemento de biorreconhecimento para aplicações em biossensores.

2.3.4.1.5. Lectinas

Interações entre proteínas e carboidratos têm sido explorados no campo de biossensores. Um bom exemplo é o da aplicação de lectinas, caracterizadas por serem proteínas especializadas no reconhecimento de determinados carboidratos presentes, por exemplo, na superfície de células cancerígenas ou na estrutura de microrganismos patogênicos (GAUTAM et al., 2020). A interação dessas lectinas se dá pelos sítios de ligação a carboidratos, onde elas podem apresentar um ou mais sítios capazes de reconhecer açúcares simples ou complexos de maneira específica, onde a depender da lectina, tal estrutura pode se organizar em estruturas homodiméricas, heterodiméricas e tetradiméricas (BARRE et al., 2019).

As lectinas são conhecidas também pela disponibilidade de obtenção de vários organismos, sendo as lectinas vegetais as mais estudadas por estarem presentes principalmente nas sementes de plantas, facilitando a obtenção e a purificação das mesmas. É estabelecido que a primeira lectina foi reportada em uma pesquisa desenvolvida no final do século XIX, sendo isolada das sementes de mamona (*Ricinus communis*), a ricina (STILLMARK, 1888). Na referida pesquisa, foi testada a reatividade do extrato dessa lectina diante de eritrócitos, o qual foram observadas aglutinações dessas células, onde, por este motivo, as lectinas foram também nomeadas como fito-hemaglutininas. Entretanto, apenas décadas depois em uma pesquisa elaborada por Watkins e Morgan foi elucidado que tal aglutinação foi desencadeada pela habilidade das lectinas em reconhecerem e se ligarem a carboidratos na superfície dos eritrócitos (HIRABAYASHI, 2014; WATKINS; MORGAN, 1952).

Com o passar dos anos, centenas de novas lectinas vem sendo reportadas na literatura e uma delas se destacou, a concanavalina. Tal lectina do gênero *Canavalia* é obtida de legumes presentes em áreas tropicais e subtropicais, servindo de alimento para animais do gado após passar por processamento de eliminação de componentes nocivos (SUVARNA; SHARMA, 2018). Em adição, os legumes de *Canavalia* apresentam aproximadamente 60 espécies e dividem em 4 subgêneros, a saber: *Canavalia*, *Catodonia*, *Maunaloa* e *Wenderothia*, cuja divisão se dá basicamente pela localização geográfica de obtenção (SNAK; AYMARD C; DE QUEIROZ, 2018).

A concanavalina A (ConA) é um dos exemplos de lectina com ampla aplicação biomédica e biotecnológica devido a sua estrutura, função e propriedades de ligação a carboidratos bem documentados. ConA é isolada de sementes do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), sendo um homotetrâmero com peso molecular de 26.5 kDa, onde cada subunidade é composta por 235 aminoácidos (COULIBALY; YOUAN, 2014). Tais características estruturais estão demonstradas na Fig. 22. Quando presente em diferentes valores de pH, ConA exibe diferentes formas, sendo a forma dimérica em pH abaixo de 6 e forma tetramérica em pH acima de 6 (XU et al., 2017).

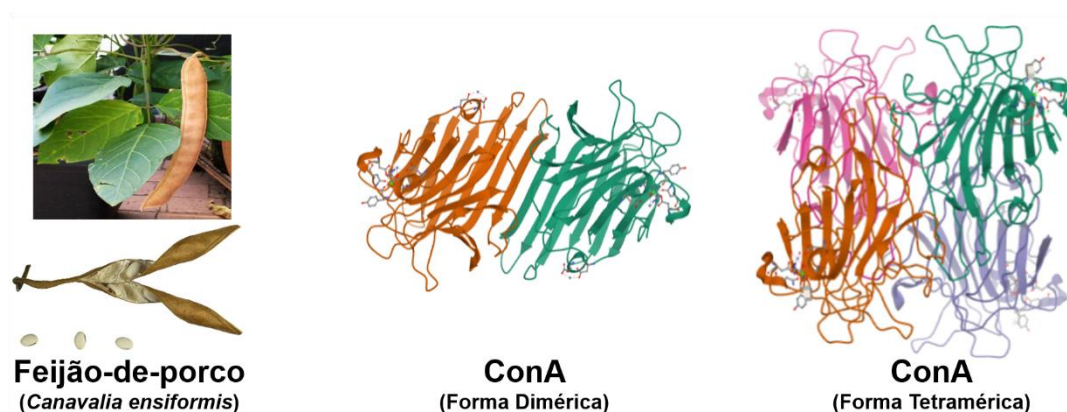


Figura 22 – Feijão-de-porco, semente de onde é isolada a lectina concanavalina A (a), forma dimérica (b) e tetramérica (c) da concanavalina A. Fonte: peptídeos: PDB; Imagem: Google imagens.

Ressaltando a afinidade a carboidratos, ConA se liga especificamente por meio de ligações de hidrogênio ao 3º, 4º e 6º carbono do sistema de anel piranosil de D-glicose (Glc), D-frutose (Frt), D-manose (Man) e N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) (HOANG et al., 2019). Tais características permitem explorar essa interação específica para múltiplas aplicações, tais como separação de células (GORAKSHAKAR; GHOSH, 2016), indução da apoptose de células cancerígenas (MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020) e na área de biossensores, permitindo identificar microrganismos como bactérias e fungos pela interação com carboidratos específicos presentes na estrutura da parede celular (LOPEZ-TELLEZ et al., 2020; MI et al., 2021).

A ConA se tornou um inovador e efetivo elemento de biorreconhecimento em biossensores graças à especificidade de sua interação com carboidratos de diversas origens. Diferentes trabalhos foram reportados, destacando a capacidade da lectina em não apenas detectar, mas também diferenciar espécies de bactérias e fungos. SÁ et al., 2020 relatou uma plataforma biossensora baseada em AuNPs onde a ConA e a lectina WGA (*wheat germ agglutinin*) foram capazes de identificar e diferenciar

quatro espécies de *Candida* spp., apresentando um limite de detecção de 10^2 CFU.mL⁻¹. Alguns monossacarídeos presentes na parede celular de *Candida* spp. como Glc e Man são dois carboidratos o qual ConA apresenta elevada afinidade, permitindo, portanto, a interação e “captura” do microrganismo pelo biossensor (MASUOKA, 2004).

Na detecção de bactérias, a interação de lectinas como a ConA se dá basicamente na interação de resíduos de Glc e Man no LPS de espécies Gram-negativas e peptidoglicano e LTA de espécies Gram-positivas (MI et al., 2021). Recentemente, YAGHOUBI et al., 2020 criou um biossensor para identificação de *E. coli* e *S. aureus* usando ConA e WGA via espectroscopia de transformada de Fourier de interferência reflectométrica (RIFTS), alcançando um limite de detecção de 10^3 UFC.mL⁻¹. Outro bom exemplo foi o sensor impedimétrico desenvolvido por LOPEZ-TELLEZ et al., 2020 em que fez uso da lectina extraída da *Hechtia argentea*, planta pertencente à família Bromeliaceae, onde através da EIS foi capaz de detectar *Salmonella* spp. com um limite de detecção de 5 UFC mL⁻¹.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de plataformas biossensoras baseadas em peptídeos antimicrobianos bioprospectados e lectinas para a detecção de microrganismos patogênicos de interesse clínico.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas metálicas e funcionalizar sua superfície com peptídeos antimicrobianos e lectinas;
- Modificar a superfície de eletrodos de trabalho com monocamadas nanoestruturadas de alcanotóis para imobilização das nanopartículas e elementos de biorreconhecimento;

- Determinar os valores de R_{CT} e demais elementos do circuito de Randles para caracterização eletroquímica da montagem das plataformas biossensoras e sua interação com microrganismos através da EIS;
- Determinar os valores das correntes de pico anódicas (i_{PA}) e catódicas (i_{PC}) das diferentes etapas de modificação dos eletrodos de trabalho por meio da VC;
- Analisar morfológica e estruturalmente o sistema sensor através da microscopia de força atômica.

4. MÉTODO

4.1. Materiais

O fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, D-glicose, ferri ($K_3[Fe(CN)_6]$) e ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) foram obtidos pela VETEC (Brasil). O N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), cloreto de ferro (III) hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), sulfato de ferro (II) heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), aminopropiltrietoxissilano (APTES), glutaraldeído (Glut), L-cisteína (Cys), ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), ácido tetracloroáurico (III) trihidratado ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), borohidreto de sódio ($NaBH_4$), hidróxido de amônio (NH_4OH), quitosana e concanavalina A (ConA) foram obtidos pela Sigma-Aldrich (Brasil). A água ultrapura utilizada no decorrer dos experimentos foi fornecida pelo sistema Millipore Milli-Q (Billerica, EUA), resistividade de 18.2 M Ω /cm.

Os AMPs utilizados foram sintetizados utilizando a técnica fluorenilmetiloxicarbonil (F-moc) e posteriormente purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obtendo uma pureza > 95%, sendo obtidos pela Aminotech (São Paulo, Brasil) e Peptide 2.0 (EUA). Os peptídeos utilizados foram a Clavanina A (ClavA) (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-NH₂), Temporina PTA (T-PTA) (FFGSVLKLIPKIL-NH₂) e Synoeca-MP (Syno-MP) (INWLKLGKKIIASL-NH₂).

4.2. Síntese e funcionalização e nanopartículas magnéticas

A síntese das Fe_3O_4 se deu pelo método da co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} de acordo com EBRAHIMINEZHAD e colaboradores (2012b), com algumas

modificações. Inicialmente, 8.5 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 4.3 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram homogeneizados em água deionizada (50 mL) e mantidas em agitação magnética a 65 °C durante uma hora. Em seguida, 5 mL de NH_4OH foi adicionado à solução e mantido em agitação por mais uma hora. A solução que outrora apresentava uma coloração marrom-amarelada, de imediato após a adição da base obteve uma coloração preta, indicativo de formação das nanopartículas. Após alcançar temperatura ambiente, as Fe_3O_4 foram separadas dos solventes utilizados via campo magnético e lavadas em água e etanol até atingirem um pH próximo a 7. Finalmente, foram secas em estufa (~37 °C) e estocadas em frasco hermético.

O presente trabalho utilizou essa classe de nanopartículas em diferentes plataformas biossensoras, onde sua superfície foi inicialmente revestida por metais e/ou polímeros naturais e por fim funcionalizada com os elementos de biorreconhecimento do estudo, a saber os peptídeos ClavA, Syno-MP e T-PTA e a lectina ConA.

Para o revestimento das Fe_3O_4 com quitosana, junto aos sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} também foi adicionado 5 mL de quitosana 2%, preparado em solução de ácido acético 0.1 M que foi adicionado gota-a-gota, seguindo os demais processos já descritos acima, resultando nas nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$.

Para a imobilização do peptídeo Syno-MP e ConA na $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$, o seguinte protocolo foi seguido: 50 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ foram suspensos em 25 mL de Glut 5% e submetidos a banho ultrassônico para dispersão e funcionalização das nanopartículas por 1 hora, etapa importante para permitir uma ligação estável entre o grupo carbonila do Glut e grupamentos amina livres da quitosana (ASIRI; KHAN; BOZKURT, 2018). Em seguida, foram lavadas usando campo magnético para remoção de moléculas de Glut não-ligadas e por fim foram ressuspensas em 1 mg.mL de Syno-MP ou ConA preparado em PBS (pH 7), seguindo de 1 hora de banho ultrassônico e 30 min de agitação em agitador orbital. As aminas livres da lectina e do AMP (localizadas no N-terminal do peptídeo) reagiram com a carbonila livre do Glut, resultando nas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Chit-SynoMP}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Chit-ConA}$.

O revestimento das Fe_3O_4 tradicionais com ouro ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$) se deu por um protocolo modificado reportado por SALEHIZADEH e equipe (2012). 100 mg das

Fe₃O₄ foram dispersas em 50 mM HAuCl₄.3H₂O em banho ultrassônico a 37 °C durante 1 hora e agitação magnética por 40 min. Tal procedimento permitiu a adsorção do Au³⁺ na superfície das Fe₃O₄. Posteriormente, 0.1 M de D-glicose preparada em água deionizada foi adicionada à suspensão anterior como agente redutor, permanecendo em agitação por 1 h (24 °C ± 2 °C). As Fe₃O₄@Au sintetizadas foram coletadas via campo magnético, lavadas em água e secas.

Uma parte dessas nanopartículas foram ainda submetidas a funcionalização com APTES, onde 100 mg das Fe₃O₄@Au foram suspensas em etanol, seguindo da adição de 5 mL de APTES a 13 mM e agitação magnética durante 12h. As Fe₃O₄@Au-APTES foram lavadas, decantadas e secas.

Também houve outra funcionalização das mesmas Fe₃O₄@Au, agora com L-cisteína. 100 mg das Fe₃O₄@Au são colocadas em um balão de fundo redondo contendo 25 mL de L-cisteína (5 M), que foi submetida a agitação magnética durante 12 horas. O grupamento tiol da cisteína se ligou covalentemente ao ouro presente na nanopartícula via quimissorção específica e perda de hidrogênio molecular, resultando nas Fe₃O₄@Au-Cys (SAKELLARI; HONDOW; GARDINER, 2020). A remoção de moléculas não ligadas, lavagem e estocagem seguiu como descrito nos procedimentos anteriores.

4.3. Montagem das plataformas sensoras nanoestruturadas

Antes de cada experimento, a superfície do eletrodo de trabalho foi polida em alumina, seguido de banho de NaClO e sonicação em água deionizada (5 min) para remoção de impurezas. Posteriormente, uma varredura em VC foi realizada entre 0.7 e -0.2 V em 10 mM [Fe(CN)₆]^{4-/3-} até o padrão característico de ouro limpo fosse obtido.

4.3.1. Plataforma MBA_ Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA

De início, o eletrodo de trabalho foi recoberto com uma MAM de MBA ao inseri-lo em uma solução etanólica de MBA 10 mM durante 30 min. Em seguida, os grupos carboxílicos livres do MBA foram ativados via EDC NHS (0.4 M EDC - 0.1 M NHS, 1:1,

v/v) durante 3 min. Em seguida, as $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-Cys}$ foram sonicadas e aplicadas à superfície do eletrodo, se ligando ao MBA. EDC NHS foi novamente aplicado para ativar o grupo carboxílico livre da cisteína, onde em seguida o peptídeo ClavA (150 μM) é adsorvido à superfície do eletrodo modificado, resultando no sistema sensor $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-Cys_ClavA}$.

4.3.2. Plataforma $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-APTES_T-PTA}$

O eletrodo foi funcionalizado com uma camada de MBA a 50 mM durante 30 min, seguido do uso dos agentes acopladores EDC NHS (0.4 M EDC - 0.1 M NHS, 1:1, v/v). A $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-APTES}$ é adsorvida à superfície do eletrodo, onde o Glut a 10% foi adicionado para ligar os grupamentos amina livres do APTES com os presentes na estrutura do peptídeo T-PTA (678 μM), que foi adicionado logo em seguida, resultando na plataforma $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-APTES_T-PTA}$.

4.3.3. Plataforma $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-ConA}$ e $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$

Novamente, o MBA foi o agente de escolha na formação da MAM na superfície de ouro do eletrodo. MBA (50 mM) em solução alcoólica foi adsorvido ao WE, seguido dos agentes EDC NHS (0.4 M EDC - 0.1 M NHS, 1:1, v/v). Com os grupos carboxílicos ativados, os mesmos puderam se ligar de modo estável às aminas livres presentes nas nanopartículas contendo a lectina ConA e o peptídeo Syno-MP, dando origem aos sistemas $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-ConA}$ e $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$.

4.4. Cepas de microrganismos e meios de cultura

Os microrganismos utilizados em todos os experimentos foram usados e estocados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Tropicais do Departamento de Micologia da UFPE e confirmados usando o equipamento MALDI-TOF-MS (Bruker Diagnósticos, Bremen, Alemanha) antes da condução dos testes. As cepas *B. subtilis* ATCC 6633, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *E. faecalis* ATCC 29212 foram cultivados em ágar nutriente. *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter*

baumannii UFPEDA 10248 e *E. coli* ATCC 25922 foram cultivados em ágar Mueller-Hinton. *C. albicans* ATCC 90028 e *C. tropicalis* URM 5732 foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose.

Todos os microrganismos semeados foram dispostos em estufa a 37 °C durante 24 horas. Duas a três colônias de cada microrganismo foi suspensa em solução salina estéril (NaCl 0.85 g/L) e separados em diferentes unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL) de acordo com a escala de McFarland no padrão 0.5 e padronizados usando um espectrofotômetro Genesys 10S Vis (Thermo Scientific) ajustado para 625 nm para as bactérias com absorbância entre 0.08 e 0.1 e 590 nm para as espécies de *Candida* com 90% de transmitância (CLSI, 2008, 2015).

4.5. Microscopia de força atômica

As plataformas sensoras foram avaliadas microscopicamente via AFM. Foi utilizado o microscópio SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japão) associado ao *software* Gwyddion. As imagens com resolução lateral de 512 x 512 pixels e área de varredura de 10 x 10 µm foram obtidas usando cantiléver com ponta de silício em modo não-contato na constante elástica de 42 N.m⁻¹ e frequência ressonante de 300 kHz, avaliando pelo menos 3 diferentes áreas em cada amostra.

4.6. Caracterização eletroquímica

As análises eletroquímicas da montagem dos sistemas sensores e da detecção dos microrganismos foi realizada via VC e EIS usando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128 N (Ecochemie, Países Baixos) interfaceado com o *software* NOVA 1.11. Uma célula eletroquímica na configuração de três eletrodos foi utilizada em todos os experimentos, onde disco de ouro ($\phi = 2$ mm) foi o ET, fio de platina o CE e prata/cloreto de prata (Ag/AgCl, KCl 3M saturado) foi o ER. Todo estudo eletroquímico ocorreu no interior de uma gaiola de Faraday.

As medidas voltamétricas foram realizadas no potencial entre -0.2 a +0.7 V e taxa de varredura de 50 mV.s⁻¹. As análises impedimétricas se deram na frequência

entre 100 mHz e 100 kHz e potencial de 10 mV. Os voltamogramas e diagramas de Nyquist foram analisados por meio do software Origin Pro 9 (Origin Lab, EUA). 15 mL de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1) preparada em tampão fosfato (PBS) pH 7 foi usado como par redox.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Sensor ClavA

A imobilização da ClavA e dos outros componentes do sistema sensor foram alcançados modificando a superfície de ouro do ET, como pode ser observado pela representação esquemática de montagem da plataforma sensora (Fig. 23).

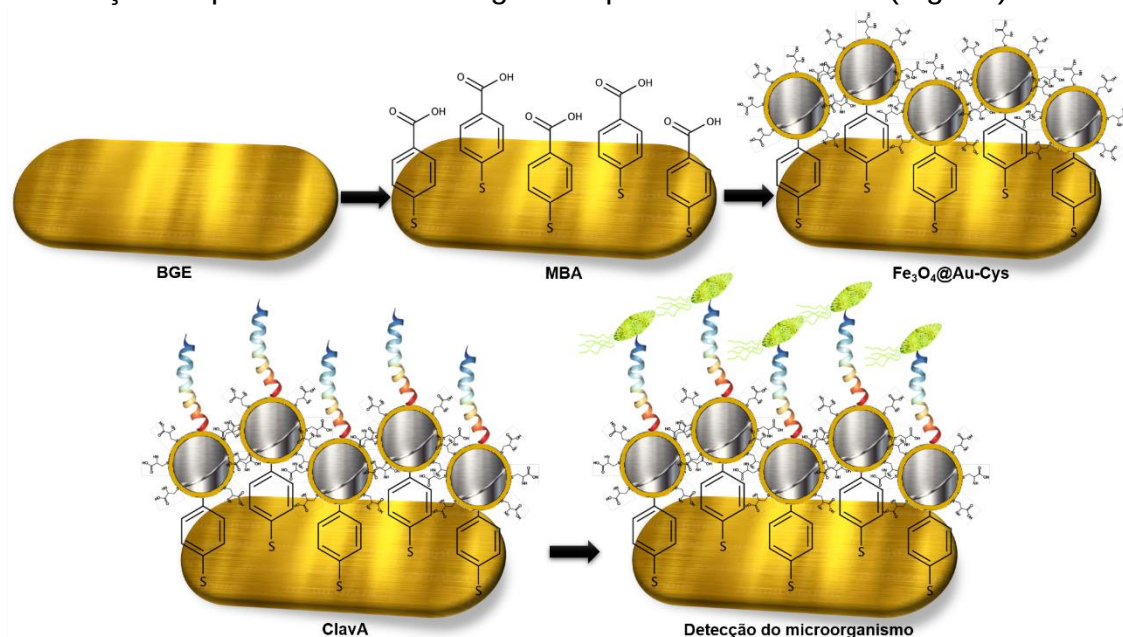


Figura 23 – Representação esquemática da plataforma MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA.

5.1.1. Análise morfológica

As propriedades topográficas do biossensor desenvolvido foram investigadas por AFM (Fig. 24), cuja abordagem avaliou cada componente imobilizado da plataforma do biossensor e a superfície sensora após a interação bacteriana.

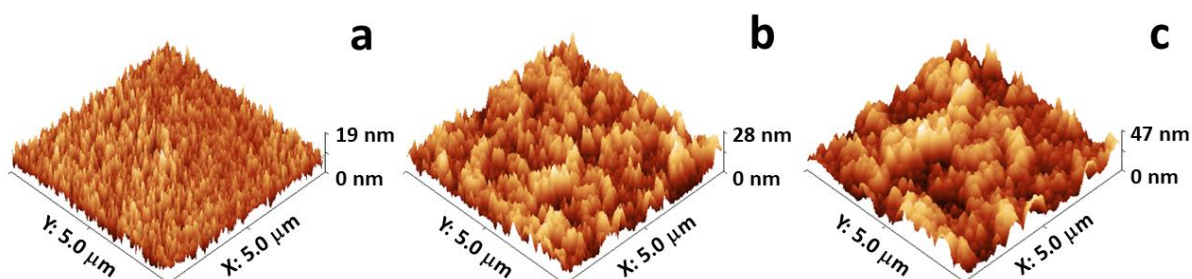


Figura 24 – Imagens 3D (5.0 μm x 5.0 μm) via AFM da topografia do processo de modificação do ET. MBA (a), MBA_Fe₃O₄@Au-Cys (b) e MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA (c).

Conforme mostrado na Fig. 24a, a morfologia da superfície da monocamada automontada de MBA sobre a superfície do ET apresenta sua cobertura homogênea, apresentando uma rugosidade média de 19 nm.

Moléculas que apresentam em sua estrutura o grupo tiol (-SH) como MBA e Cys são amplamente utilizadas na área de biossensores graças aos seus grupos funcionais, permitindo a criação de diferentes estruturas e forte ligação a superfícies de ouro (HAUPTMANN et al., 2016). Posteriormente, a rugosidade foi aumentada para 28 nm após a ligação covalente $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-Cys}$ à monocamada de MBA (Fig. 24b), revelando o valor médio das nanopartículas com resultado semelhante relatado por Costa et al. (COSTA et al., 2014). Por fim, após a deposição de ClavA, obteve-se um aumento considerável na altura média, com 47 nm (Fig. 24c), semelhante a estudos anteriores (ANDRADE et al., 2015; SILVA JUNIOR et al., 2018). Esses resultados apontam para imobilização bem-sucedida e montagem de cada componente do biossensor.

5.1.2. Caracterização eletroquímica da plataforma sensora

VC e EIS são ferramentas inovadoras empregadas para avaliar a funcionalização da superfície do eletrodo, estudando as alterações das propriedades elétricas e integridade das camadas moleculares (SKLÁDAL, 2014; TANIMOTO; ICHIMURA, 2013). Nesse sentido, ambas técnicas foram aplicadas para obter dados referentes após a modificação gradual do eletrodo durante a fabricação do sensor conforme visto na Fig. 25.

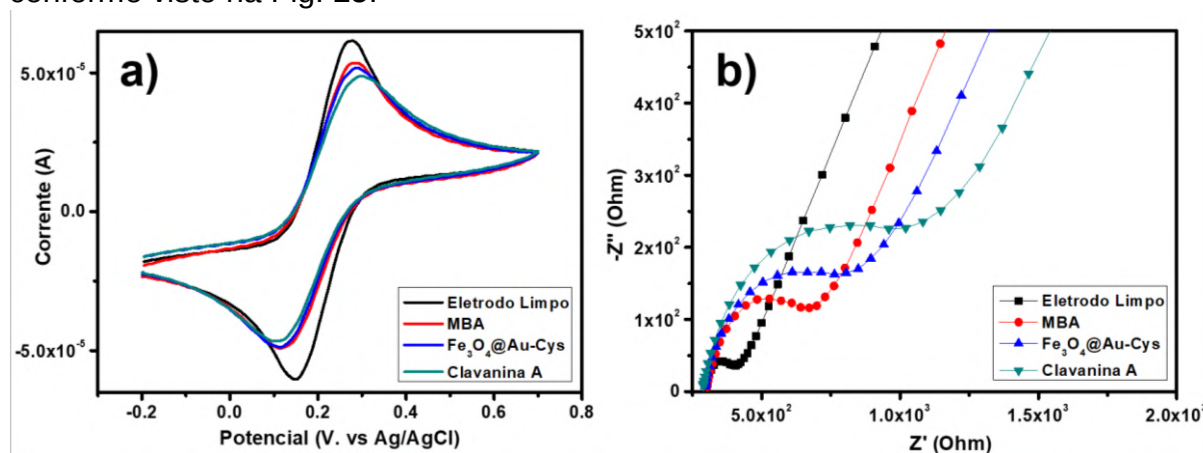


Figura 25 – Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do processo de montagem da plataforma sensora MBA_ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-Cys}$ _ClavA.

Inicialmente, os voltamogramas cíclicos obtidos (Fig. 25a) perfis mostram uma resposta reversível do ET diante da sonda redox em PBS pH 7,4. As análises voltamétricas foram realizadas usando os dados de corrente de pico anódico (ipa). O ET limpo apresentou uma resposta elétrica de 51,59 μA . Resumidamente, com a adsorção dos diferentes componentes do biossensor foi observada uma diminuição consecutiva na resposta amperométrica do eletrodo, resultando na diminuição dos picos catódicos e anódicos. A deposição de MBA ocorreu por uma ligação covalente de seu grupo tiol à superfície do ouro (S-Au) (ZHOU et al., 2015).

A diminuição obtida na resposta de pico (45,91 μA) certifica a formação da MAM. A transferência de elétrons na solução eletrolítica foi aprimorada devido ao anel aromático em sua estrutura (COSTA et al., 2014; LUNA et al., 2015). Em um estudo conduzido por Hauptmann et al. (HAUPTMANN et al., 2016) com monocamadas de MBA em Au (110) foi observado que, embora uma ligação S-Au ajude a uma orientação vertical do MBA, as fortes interações de van der Waals entre as moléculas de MBA podem mudar sua orientação especial, levando a um ângulo de inclinação próximo a superfície de ouro do eletrodo.

Visando uma ligação prolongada e estável entre o grupo carboxila livre de MBA e o grupo terminal amina da Cys presente nas nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -Cys modificadas, agentes acopladores EDC-NHS foram usados. O acoplamento de amina através da química EDC-NHS promove a substituição do grupo carboxílico eletronegativo de MBA pelo éster NHS carregado positivamente, reduzindo a intensidade de sua resposta amperométrica e dos demais componentes do sensor (AMAL et al., 2018; FISCHER, 2010).

Nanopartículas metálicas são amplamente utilizadas no desenvolvimento de biossensores devido à sua elevada área de superfície e propriedades eletrônicas [36]. Além disso, uma maior sensibilidade é alcançada quando explorada em abordagens eletroquímicas graças a mudanças nas respostas ôhmicas, desencadeando processos como oxidação e redução na superfície do eletrodo, além de modular a corrente elétrica na interface da sonda redox (DORIA et al., 2012). A adsorção de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -Cys resultou em uma diminuição no ipa (42,56 μA), o que certifica uma ligação covalente ao filme MBA impulsionalada por seus grupos funcionais livres. Finalmente, ClavA foi imobilizado no eletrodo de ouro modificado com

MBA_Fe₃O₄@Au-Cys com uma adsorção prévia de EDC-NHS, resultando em uma ligação amida. Em seguida, uma nova diminuição foi observada nas correntes de pico, com ipa 40,33 μ A. Esta diminuição resultou da ligação do terminal N de ClavA ao grupo carboxila livre da Cys, levando a um aumento da espessura na interface eletrodo-sonda redox (LI et al., 2014).

Após a análise voltamétrica, EIS foi usada para obter informações adicionais referentes à cinética de transferência de elétrons e mudanças interfaciais na superfície do eletrodo. Qualquer obstáculo imobilizado na superfície resulta no bloqueio de transferência de elétrons, dificultando a difusão dos K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻. O EIS fornece dados sobre o R_{CT}, sendo melhor observado na variação do diâmetro do semicírculo (BARSOUKOV; MACDONALD, 2018). Resumidamente, foi obtido um aumento sucessivo do diâmetro do semicírculo, intimamente relacionado ao que foi observado nas curvas voltamétricas.

Na Fig. 25b apresentam-se os espectros de impedância obtidos relativos ao processo de montagem da plataforma sensora foram realizados em 100 mHz a 100 kHz como faixa de frequência. A superfície limpa do eletrodo de ouro revela um semicírculo de pequeno diâmetro (R_{CT} = 121 Ω), indicando a ausência de uma camada de bloqueio na interface do par eletrodo-redox, levando a uma fácil transferência de elétrons em um processo difusional. A adsorção do MBA resultou em um aumento no valor de R_{CT} (R_{CT} = 388 Ω), associado à obtenção da MAM. A curva impedimétrica correspondente à deposição de Fe₃O₄@Au-Cys na monocamada de MBA mostrou um aumento adicional de R_{CT} (R_{CT} = 583 Ω) devido às características de condução de elétrons da camada de ouro presente no Fe₃O₄ modificado. Como esperado, a imobilização de ClavA no eletrodo modificado apresentou maior resistência à transferência de elétrons interfacial (R_{CT} = 840 Ω). Nesse sentido, os valores de R_{CT} seguem a sequência ClavA > Fe₃O₄@Au-Cys > MBA.

Ressalta-se que a principal característica da aplicabilidade do EIS na pesquisa de biossensor se justifica na avaliação do R_{CT} após um bloqueio físico de uma superfície específica realizada por um analito, levando a uma resposta equivalente relacionada à sua quantidade em uma amostra, como a água (RAM et al., 2016).

5.1.3. Detecção de microrganismos

A interação da plataforma MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA com microrganismos se deu na interação de suspensões bacterianas de 10¹ a 10⁶ UFC.mL⁻¹ durante 5 minutos e posterior análise via EIS para obtenção dos diagramas de Nyquist, como demonstrado na Fig. 26 para detecção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os seguintes microrganismos foram avaliados: *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 7000603, *A. baumannii* UFPEDA 10248, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* e *E. coli* ATCC 25922.

Destaca-se a influência da amostra líquida onde todos os microrganismos foram suspensos, que segundo Zelada-Guillén et al. (ZELADA-GUILLÉN et al., 2010), medições elétricas, como observadas em análises voltamétricas e impedimétricas, requerem controle da força iônica da amostra. Nesse sentido, visando evitar resultados falso-positivos, optou-se por um meio PBS controlado (10 mM, pH 7), uma vez que a carga superficial presente na parede celular microbiana alvo é um dos fatores cruciais que promove a interação inicial com o biossensor, resultando em mudanças específicas na transferência de elétrons (RAM et al., 2016). Diversas plataformas biossensoras eletroquímicas usando peptídeos e lectinas como elementos de reconhecimento para identificação de microrganismos exploram a avaliação via EIS devido à sua sensibilidade em fornecer uma resposta proporcional à camada de bloqueio formada após interação sensor-analito alvo (SÁ et al., 2020; SILVA JUNIOR et al., 2018). Os espectros de impedância da detecção das bactérias são mostrados na Fig. 26.

De imediato percebe-se que as bactérias Gram-positivas obtiveram resposta impedimétrica menor do que observado pelas bactérias Gram-negativas, ressaltando maior afinidade do peptídeo ClavA frente essas espécies inicialmente devido a atração eletrostática desencadeada pelo AMP altamente catiônico com a superfície aniônica da ClavA (ANDRADE et al., 2015; LI et al., 2017).

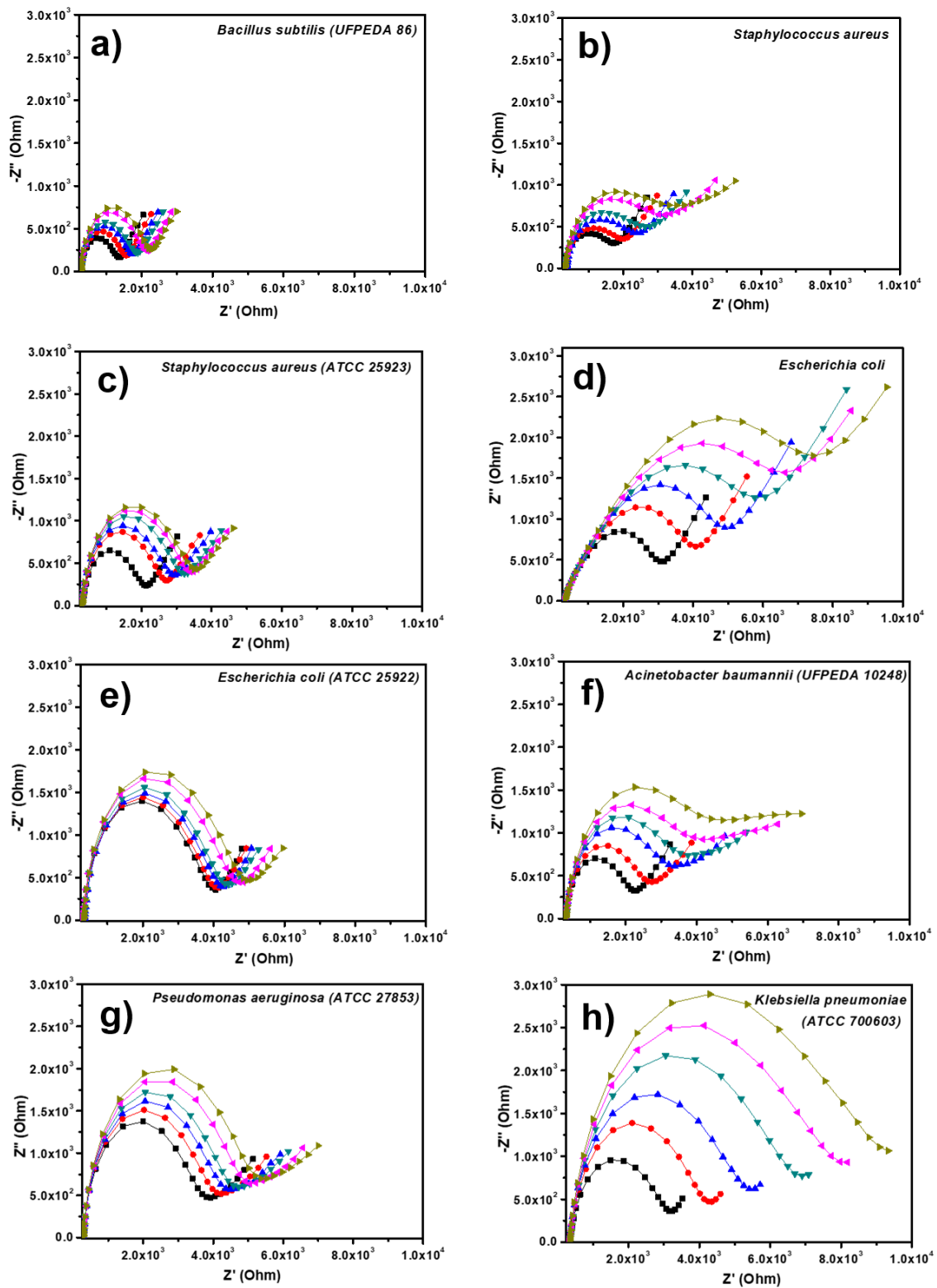


Figura 26 – Resposta impedimétrica da detecção dos microrganismos pela plataforma MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA. ■10¹ UFC.mL, ●10² UFC.mL, ▲10³ UFC.mL, ▼10⁴ UFC.mL, ◀10⁵ UFC.mL, ▶10⁶ UFC.mL.

A Tabela 3 apresenta os valores dos elementos do circuito equivalente de Randles obtido a partir dos resultados impedimétricos, onde a plataforma foi capaz de diferenciar entre Gram-positivas (Tabela 3a) e Gram-negativas (Tabela 3b). As mudanças mais expressivas dentre os componentes foram as destacadas pelo CPE e R_{CT} . Enquanto o CPE está intrinsecamente relacionado às variações na área de superfície ativa do biossensor com a espessura da DCE formada na interface com a sonda redox, o R_{CT} traz informações diretas sobre as mudanças nesta superfície relacionadas ao bloqueio formado após interação com o analito-alvo, dificultando a cinética de reação redox (CÓRDOBA-TORRES; MESQUITA; NOGUEIRA, 2015).

Tabela 3 – Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma biossensora MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA. Espécies Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b).

a)						b)					
Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R_{ct} (k Ω)	Q (μ F)	n	R_{Ω}	W	Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R_{ct} (k Ω)	Q (μ F)	n	R_{Ω}	W
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633						<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603					
10 ¹	1,62	3,15	0,821	3,29	9,67	10 ¹	3,9	2,8	0,78	3,05	5,08
10 ²	1,77	3,18	0,823	3,24	9,5	10 ²	4,89	2,83	0,78	3,12	4,05
10 ³	1,93	3,02	0,825	3,32	9,26	10 ³	5,94	2,85	0,77	3,10	3,12
10 ⁴	2,03	2,9	0,828	3,31	8,9	10 ⁴	7,61	3,85	0,72	1,17	2,62
10 ⁵	2,13	2,94	0,826	3,33	8,8	10 ⁵	7,73	2,63	0,77	3,19	1,89
10 ⁶	2,29	2,91	0,825	3,63	8,69	10 ⁶	7,81	2,26	0,78	3,12	1,67
<i>Staphylococcus aureus</i>						<i>Acinetobacter baumannii</i> UFPEDA 10248					
10 ¹	1,70	1,59	0,844	3,15	9,56	10 ¹	1,79	1,6	0,87	3,05	1,00
10 ²	2,25	1,45	0,856	3,16	8,95	10 ²	2,31	2,45	0,82	2,99	7,76
10 ³	2,47	1,5	0,852	2,95	8,02	10 ³	2,98	2,58	0,81	3,01	6,4
10 ⁴	2,76	1,46	0,853	2,98	8,00	10 ⁴	3,05	2,72	0,81	3,03	3,39
10 ⁵	2,92	1,40	0,857	3,03	8,03	10 ⁵	3,89	2,89	0,79	3,04	4,03
10 ⁶	3,11	1,41	0,854	2,98	7,49	10 ⁶	4,52	2,84	0,79	2,99	4,03
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923						<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					
10 ¹	1,94	9,92	0,66	2,97	9,51	10 ¹	3,43	8,25	0,880	2,75	6,82
10 ²	2,38	1,06	0,65	2,98	9,16	10 ²	3,74	8,14	0,882	2,72	6,5
10 ³	2,69	1,07	0,64	2,88	8,45	10 ³	4,00	8,06	0,885	2,84	6,08
10 ⁴	3,29	1,14	0,63	2,99	8,02	10 ⁴	4,24	7,83	0,881	2,72	5,95
10 ⁵	3,88	1,08	0,63	2,92	6,94	10 ⁵	4,58	7,80	0,889	2,8	5,73
10 ⁶	4,35	1,08	0,62	2,78	6,31	10 ⁶	4,89	7,78	0,889	2,78	5,4
						<i>Escherichia coli</i>					
						10 ¹	3,62	5,19	0,702	3,18	6,06
						10 ²	4,48	5,08	0,699	3,11	4,78
						10 ³	4,95	5,99	0,670	4,4	4,41
						10 ⁴	5,49	6,25	0,660	3,08	3,62
						10 ⁵	6,26	5,46	0,660	3,28	3,62
						10 ⁶	7,01	4,54	0,680	3,25	2,38
						<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					
						10 ¹	3,46	8,25	0,880	3,1	8,84
						10 ²	3,53	8,04	0,891	3,21	8,63
						10 ³	3,65	7,96	0,884	3,51	8,65
						10 ⁴	3,8	7,81	0,893	3,23	8,37
						10 ⁵	4,12	7,95	0,892	3,03	8,11
						10 ⁶	4,33	7,86	0,891	3,02	7,63

Portanto, conforme resultados apresentados na Tabela 3 corroboram a capacidade do eletrodo modificado por ClavA em reconhecer e discriminar entre as espécies de acordo com os valores de R_{CT} . Dessa forma, o biossensor foi submetido à avaliação da variação relativa do R_{CT} (ΔR_{CT}):

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT}(\text{microrg}) - R_{CT}(\text{biossensor})}{R_{CT}(\text{biossensor})} \times 100 \quad \text{Eq. 24}$$

onde $R_{CT}(\text{microrg})$ é o valor do R_{CT} após a exposição às suspensões microbianas e $R_{CT}(\text{biossensor})$ é o valor R_{CT} para a plataforma MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA, com resultado demonstrado na Fig. 27.

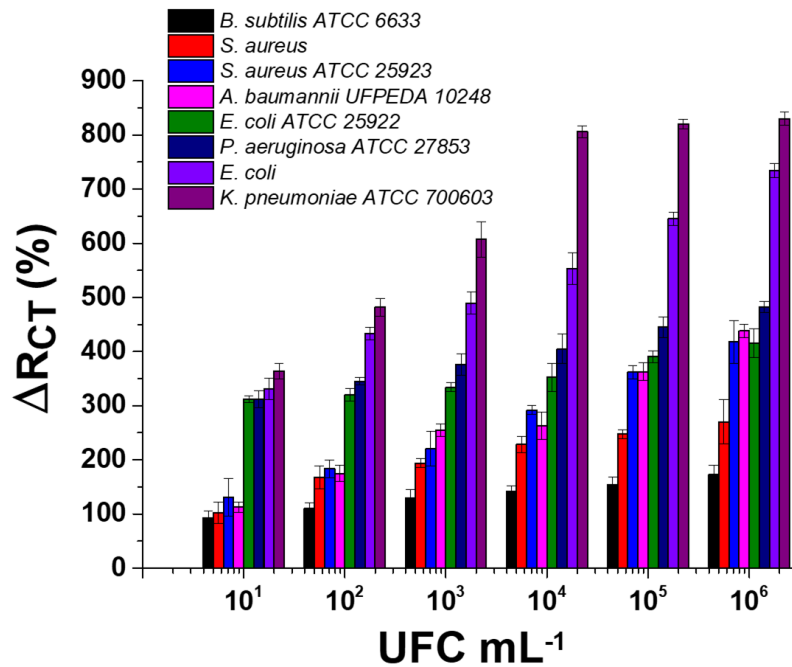


Figura 27 - ΔR_{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos.

O resultado revela uma relação direta entre os valores de ΔR_{CT} e a concentração bacteriana, indicando uma resposta quantitativa após a ligação das diferentes espécies à camada de bioreconhecimento montada no eletrodo modificado. O sistema MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA revelou uma resposta impedimétrica como segue: *K. pneumoniae* > *E. coli* > *P. aeruginosa* > *E. coli* ATCC 25922 > *A. baumannii* > *S. aureus* > *S. aureus* ATCC 25923 > *B. subtilis*.

5.2. Sensor Temporina-PTA

Uma representação esquemática da plataforma sensora baseada em T-PTA pode ser observada na Fig. 28.

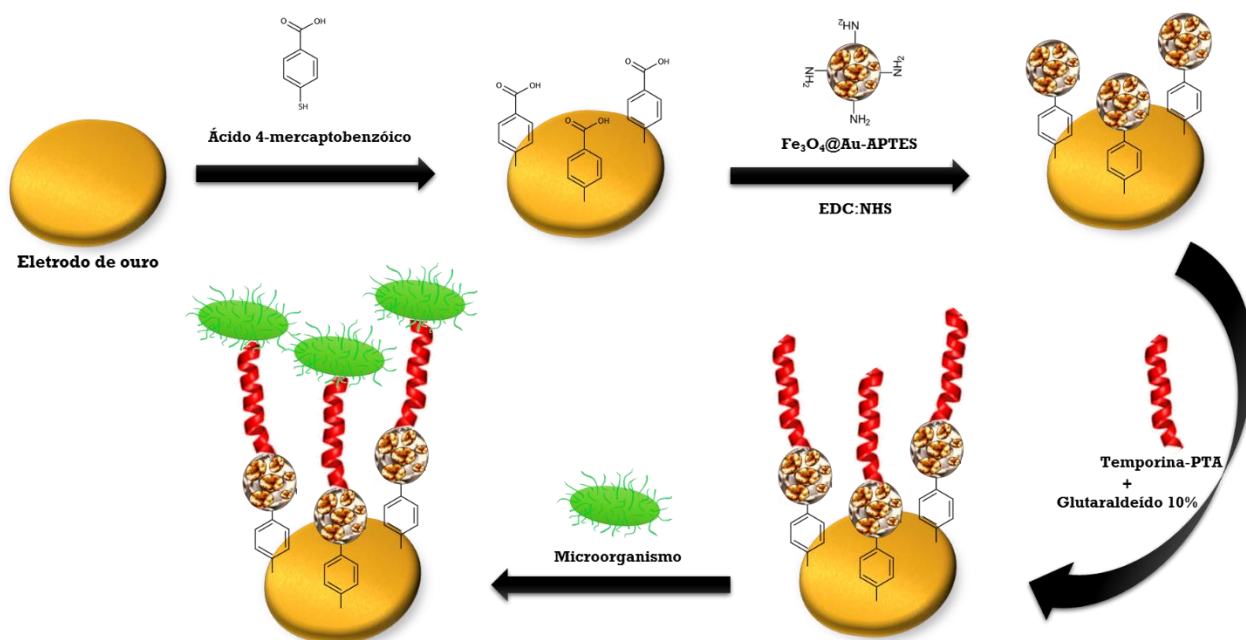


Figura 28 – Ilustração do processo de montagem do sistema sensor MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA.

5.2.1. Análise morfológica

AFM foi utilizada na avaliação do processo de montagem do biossensor e após interação com microrganismos. A Fig. 29 apresenta as imagens topográficas do AFM. Após a adsorção do MBA no substrato de ouro, a superfície lisa foi modificada devido à formação da MAM. Observamos valores de diâmetro de 14 nm (Fig. 29a), conforme trabalhos anteriores (COSTA et al., 2014; PENSA et al., 2012).

Em sequência, após a adsorção de Fe₃O₄@Au-APTES, observou-se um aumento na rugosidade, com altura de 31 nm (Fig. 29b). Posteriormente, após a imobilização da T-PTA, foi obtida uma alteração na rugosidade do sistema, com altura de 44 nm (Fig. 29c). Tais resultados são corroborados por estudos anteriores (ANDRADE et al., 2015; SÁ et al., 2020).

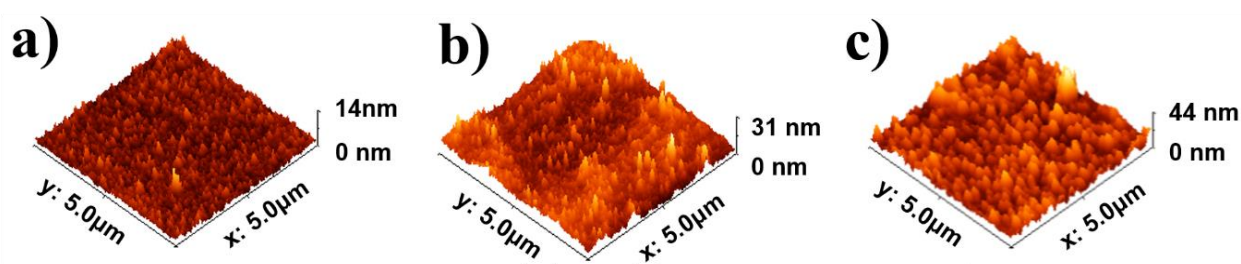


Figura 29 – Análise topográfica da plataforma sensora via AFM (5.0 μm x 5.0 μm). MBA (a), MBA_Fe₃O₄@Au-APTES (b) e MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA (c).

5.2.2. Caracterização eletroquímica da plataforma sensora MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA

A montagem do sistema sensor T-PTA é descrita na Fig. 30. Conforme demonstrado na Fig. 30a, as correntes dos picos anódicos e catódicos revelaram mudanças expressivas nos voltamogramas durante a funcionalização da superfície do eletrodo. Uma resposta redox reversível do ET (Fig. 30a voltamograma preto) após o processo de limpeza com picos redox bem definidos pode ser observada ($i_{PC} = -8,1779$ A). Após a modificação do ET por MBA (Fig. 30a voltamograma vermelho), uma diminuição em ambos os picos foi obtida ($i_{PC} = -4,7590$ A). Este fenômeno ocorre devido ao bloqueio da transferência de elétrons alcançada através de uma forte ligação de ouro-tiol (Au-S) (XUE et al., 2014).

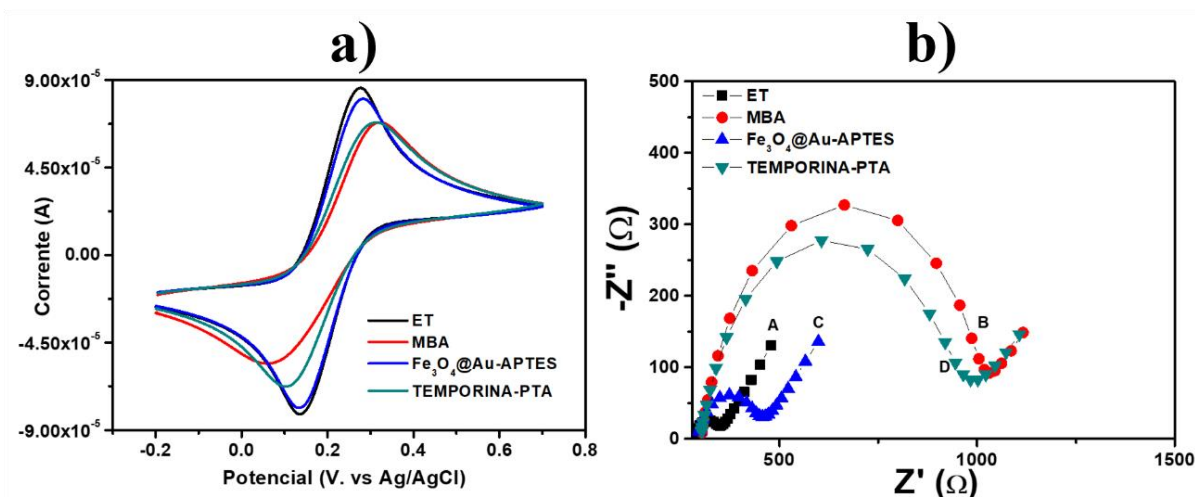


Figura 30 - Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do processo de montagem da plataforma sensora MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA.

A estrutura do MBA composta por um anel aromático promove um tunelamento dos elétrons do par redox (GONZÁLEZ et al., 2014). Além disso, seus grupos -COOH terminais permitem a ligação de biomoléculas específicas e nanopartículas funcionalizadas ao eletrodo de trabalho.

A adição dos agentes EDC:NHS seguido pela adsorção de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -APTES (Fig. 30a voltamograma azul) promoveu um aumento na corrente de pico ($i_{\text{PC}} = -7,8079$ A). Este evento ocorre devido ao aumento da condutividade elétrica das nanopartículas magnéticas revestidas de ouro, além dos grupos carboxílicos livres do MBA serem convertidos em ésteres NHS neutros (KATZ, 2019). A imobilização de T-PTA (Fig. 30a voltamograma verde) no $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -APTES alcançada através da ligação covalente promovida pelo glutaraldeído levou a uma diminuição nas correntes de pico ($i_{\text{PC}} = -6,3518$ A).

A diminuição da resposta amperométrica foi devido ao efeito de bloqueio do peptídeo ao sistema sensor impedindo que os íons do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ alcancem a superfície do eletrodo e sofram a reação redox. Esses resultados indicam a imobilização de MBA, nanopartículas funcionalizadas e do peptídeo na superfície do ET.

A análise impedimétrica da montagem do sensor pode ser avaliada pela variação do R_{CT} , cujo valor pode ser obtido pelo espectro impedimétrico dos componentes do biossensor e analitos alvo presentes em uma amostra, como microrganismos (RAM et al., 2016). O ET após o processo de limpeza descreve um minúsculo semicírculo ($R_{\text{CT}} = 0,64 \Omega$) obtido devido à difusão dos íons da sonda redox (Fig. 30b curva "A"). Posteriormente, a quimissorção de MBA levou a uma grande resistência interfacial à transferência de carga ($R_{\text{CT}} = 0,691 \text{ k}\Omega$), um claro indicativo da formação de SAM (Fig. 30b curva "B"). Seguindo esta etapa, após substituir os grupos -COOH terminais do MBA por um éster NHS e a deposição das nanopartículas (Fig. 30b curva "C"), uma diminuição no R_{CT} foi observada ($R_{\text{CT}} = 0,165 \text{ k}\Omega$). Posteriormente, a imobilização de T-PTA (Fig. 30b curva "D") resultou em um aumento significativo de R_{CT} ($R_{\text{CT}} = 0,665 \text{ k}\Omega$).

5.2.3. Performance analítica do sensor

As respostas voltamétricas dos microrganismos testados após a interação com o biossensor são mostradas na Fig. 31 a-f. Após o processo de reconhecimento, observou-se queda expressiva nos picos anódico e catódico, proporcional ao aumento das concentrações microbianas. O peptídeo imobilizado foi capaz de detectar seis espécies microbianas diferentes, mostrando a aplicabilidade da T-PTA na detecção de bactérias e leveduras em concentrações clinicamente relevantes.

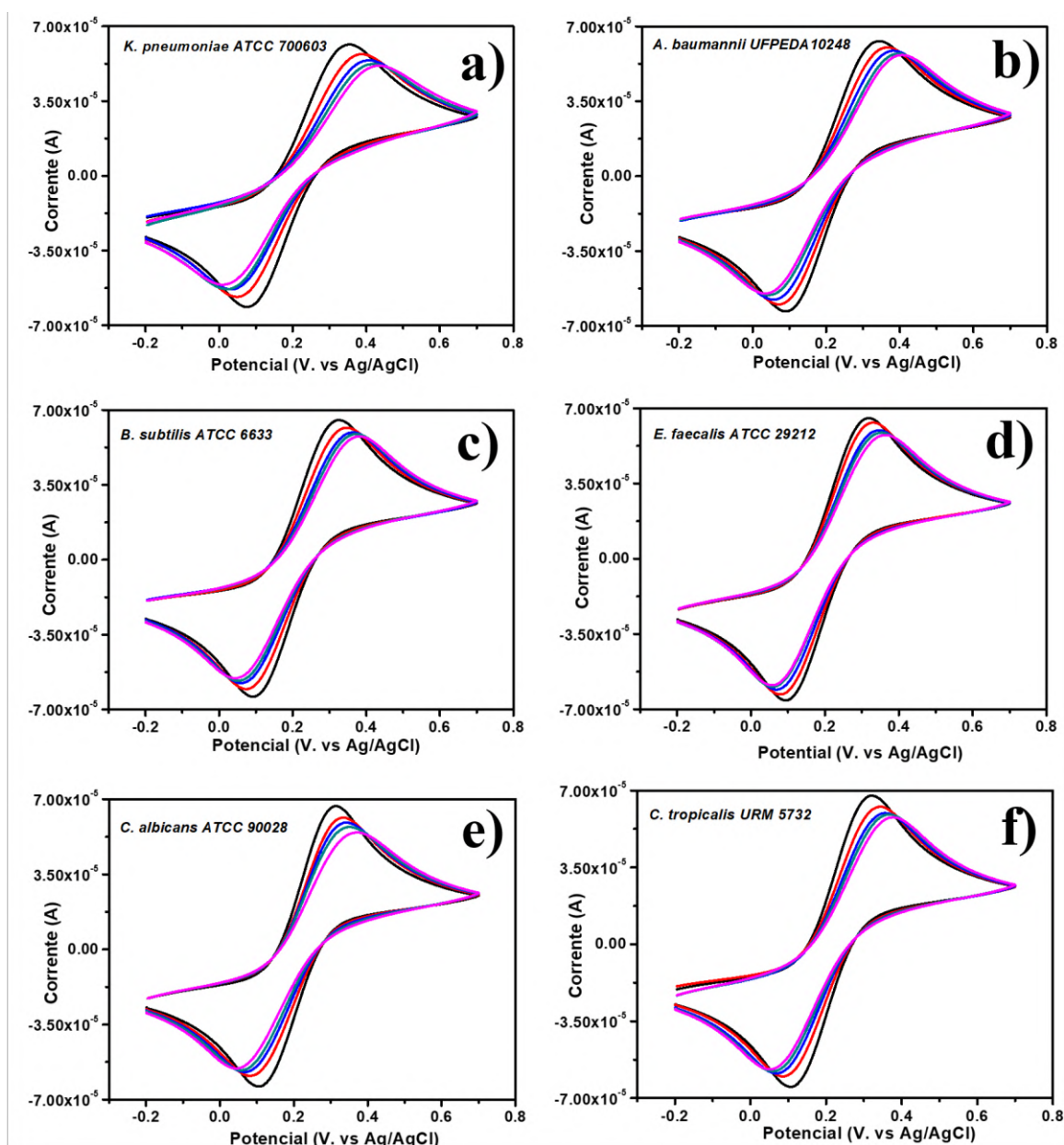


Figura 31 - Voltamogramas cíclicos referentes à detecção das diferentes espécies de microrganismos de 10^1 a 10^5 UFC mL. a) *K. pneumoniae* ATCC 700603, b) *A. baumannii* UFPEDA10248, c) *B. subtilis* ATCC 6633, d) *E. faecalis* ATCC 29212, e) *C. albicans* ATCC 90028, f) *C. tropicalis* URM 5732.

Seguindo os parâmetros obtidos na resposta voltamétrica após a interação com espécies microbianas, o grau de reconhecimento pode ser avaliado através da porcentagem de desvio relativo da variação da corrente anódica (ΔI) (DE MIRANDA et al., 2017):

$$\Delta I (\%) = \frac{\left[\left(\frac{1}{I_b}\right) - \left(\frac{1}{I_a}\right)\right]}{\left(\frac{1}{I_b}\right)} \times 100 \quad \text{Eq. 25}$$

onde I_a corresponde à corrente de pico anódica obtida após a imobilização de T-PTA e I_b é a corrente de pico anódica após interação com o alvo biológico.

A Tabela 4 mostra os resultados de ΔI antes e depois da reação com suspensões de bactérias e leveduras em diferentes concentrações. Os valores de ΔI revelaram uma correlação direta com a concentração bacteriana e fúngica, acompanhando o aumento da concentração em UFC.mL.

Tabela 4 – Variação da corrente anódica (i_{PA}) da detecção das diferentes espécies de bactérias e fungos (10^1 - 10^5 UFC mL⁻¹).

Microrganismos	T-PTA (i_{PA})	UFC mL ⁻¹ (i_{PA})				
		10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
	6,5867					
<i>K. pneumoniae</i>		5,5594	4,8163	4,3427	4,1326	3,8489
ΔI (%)		15,59%	26,87%	34,06%	37,25%	41,56%
<i>A. baumannii</i>		5,8272	5,3438	5,0331	4,7398	4,5889
ΔI (%)		11,53%	18,87%	23,58%	28,04%	30,33%
<i>B. subtilis</i>		6,1786	5,6541	5,269	5,116	4,9327
ΔI (%)		6,19%	14,18%	20%	22,33%	25,11%
<i>E. faecalis</i>		6,3778	6,0581	5,5754	5,4041	5,2086
ΔI (%)		3,17%	8,02%	15,35%	17,95%	20,92%
<i>C. albicans</i>		6,5755	5,8238	5,5359	5,2659	4,874
ΔI (%)		0,17%	11,58%	15,95%	20,05%	26,11%
<i>C. tropicalis</i>		6,4912	5,7834	5,4716	5,3019	5,0489
ΔI (%)		1,44%	12,19%	16,92%	19,50%	23,34%

Os dados impedimétricos para a detecção de bactérias e espécies de *Candida* são mostrados na Fig. 32 a-f para T-PTA. Pode-se notar facilmente que o sistema T-PTA revelou maior resistência à transferência de carga para as bactérias Gram-negativas (*K. pneumoniae* > *A. baumannii*), seguido por *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *C. tropicalis*, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por outras plataformas de biossensores baseadas em peptídeos antimicrobianos focadas na detecção de microrganismos de interesse clínico desenvolvidas pelo grupo (ANDRADE et al., 2015; SILVA JUNIOR et al., 2018).

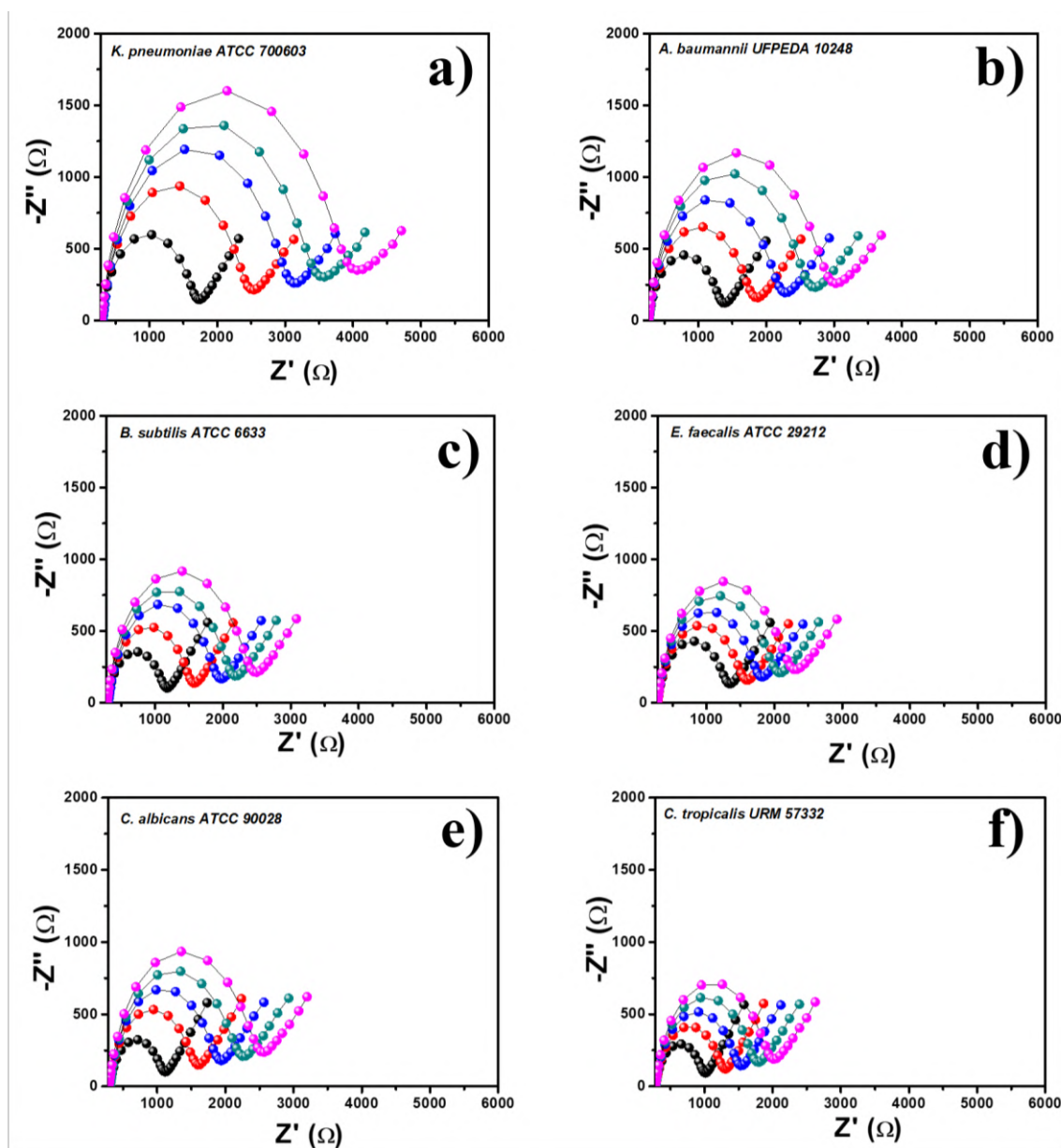


Figura 32 – Diagramas de Nyquist referentes à detecção de microrganismos pela plataforma MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA. a) *K. pneumoniae* ATCC 700603, b) *A. baumannii* UFPEDA10248, c) *B. subtilis* ATCC 6633, d) *E. faecalis* ATCC 29212, e) *C. albicans* ATCC 90028, f) *C. tropicalis* URM 5732.

Mudanças nos valores dos elementos do circuito equivalente de Randles também foram avaliadas a partir dos resultados impedimétricos dos microrganismos, conforme observado na Tabela 5. Os resultados demonstram que o peptídeo T-PTA possui potencial para reconhecer e discriminar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Tabela 5 - Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA.

Eletrodo modificado	UFC mL ⁻¹	R _{CT} (kΩ)	CPE (μF)	R _s	W
Sensor T-PTA	-	0,665	1,37	0,302	1,54
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10 ¹	1,38	1,08	0,296	1,46
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10 ²	2,15	1,02	0,296	1,38
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10 ³	2,72	0,965	0,317	1,30
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10 ⁴	3,13	0,960	0,304	1,23
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10 ⁵	3,62	0,948	0,295	1,18
<i>A. baumannii</i> UFPEDA 10248	10 ¹	1,07	1,11	0,270	1,45
<i>A. baumannii</i> UFPEDA 10248	10 ²	1,53	1,03	0,271	1,37
<i>A. baumannii</i> UFPEDA 10248	10 ³	1,94	0,934	0,275	1,33
<i>A. baumannii</i> UFPEDA 10248	10 ⁴	2,34	0,902	0,277	1,28
<i>A. baumannii</i> UFPEDA 10248	10 ⁵	2,66	0,886	0,271	1,24
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 ¹	0,844	1,37	0,300	1,49
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 ²	1,23	1,21	0,297	1,48
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 ³	1,60	1,16	0,316	1,42
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 ⁴	1,82	1,11	0,300	1,39
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10 ⁵	2,11	1,08	0,297	1,36
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10 ¹	1,03	1,80	0,277	1,47
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10 ²	1,27	1,60	0,282	1,44
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10 ³	1,49	1,47	0,279	1,42
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10 ⁴	1,74	1,40	0,279	1,40
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10 ⁵	1,96	1,33	0,280	1,34
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10 ¹	0,777	1,59	0,309	1,43
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10 ²	1,25	1,36	0,302	1,36
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10 ³	1,57	1,26	0,305	1,35
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10 ⁴	1,87	1,22	0,317	1,28
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10 ⁵	2,17	1,21	0,299	1,26
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10 ¹	0,696	1,64	0,282	1,51
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10 ²	0,972	1,45	0,287	1,47
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10 ³	1,20	1,37	0,285	1,45
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10 ⁴	1,44	1,32	0,287	1,41
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10 ⁵	1,67	1,27	0,283	1,36

Variações no diâmetro do semicírculo sugerem o evento de detecção na superfície do biossensor, cuja variação é diretamente proporcional aos microrganismos e organelas celulares livres na suspensão, resultando em valores crescentes de R_{CT} . Por outro lado, os valores de CPE estão diminuindo, refletindo a redução dos locais de detecção livres (área de superfície efetiva do eletrodo) na superfície do eletrodo modificada por T-PTA (SAXENA; SRIVASTAVA, 2019).

Monitorando as mudanças de impedância, os dados de reconhecimento microbiano revelaram o maior R_{CT} para bactérias Gram-negativas (*K. pneumoniae* e *A. baumannii*, respectivamente). Tal resultado deve-se às forças de atração entre a superfície positivamente carregada do T-PTA e a forte carga negativa líquida das espécies Gram-negativas, levando à interação inicial seguida pela inserção e permeabilização da parede celular (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Além disso, a amidação do terminal C de AMPs alfa-hélice, como observado na estrutura T-PTA (FFGSVLKLIPKIL-NH₂) está relacionada à melhoria dessa interação eletrostática e na promoção da estabilização de sua estrutura helicoidal na interface microbiana (STRANDBERG et al., 2007).

Foi obtido um limite de detecção (LOD) de 10^1 UFC mL⁻¹ para todas as bactérias e espécies de *Candida* examinadas por meio de análises eletroquímicas. O sistema sensor revelou um LOD inferior ao observado em situações clínicas como bacteremia e bacteriúria, onde até 15 UFC mL⁻¹ e 10^2 - 10^4 UFC.mL⁻¹ é a concentração usual de microrganismos encontrados no sangue e na urina, respectivamente (PARK et al., 2012; TULLUS, 2019). Os resultados apresentados na Fig. 32 corroboram a capacidade do eletrodo modificado por T-PTA em reconhecer e discriminar entre as espécies microbianas de acordo com os valores de R_{CT} , portanto, o biossensor desenvolvido foi submetido à avaliação da variação relativa da R_{CT} (ΔR_{CT}), como referido na Eq. 24.

O resultado revela uma relação direta entre os valores de ΔR_{CT} e a concentração microbiana, indicando uma resposta quantitativa após a ligação de bactérias e leveduras à camada de reconhecimento biológico. Como visto na Fig. 33, foi encontrado valores crescentes, como segue: *C. tropicalis* < *E. faecalis* < *B. subtilis* < *C. albicans* < *A. baumannii* < *K. pneumoniae*.

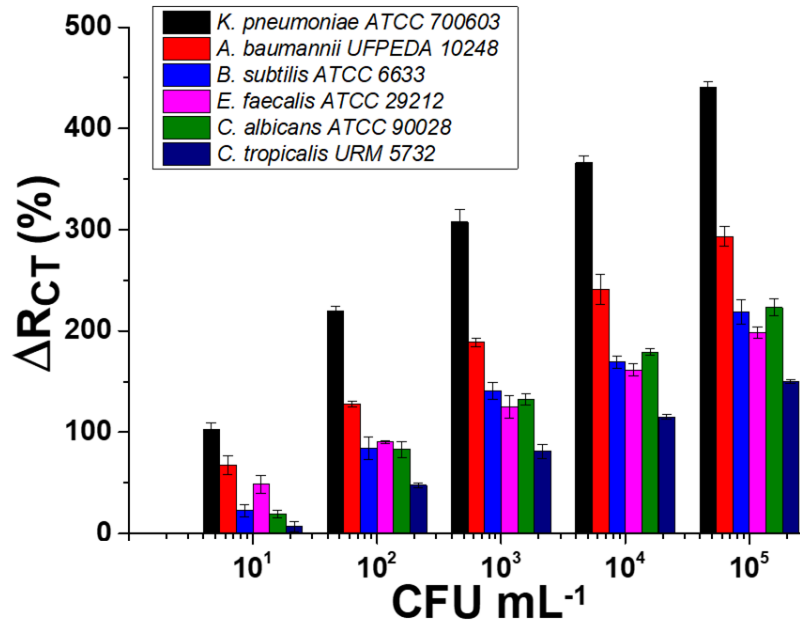


Figura 33 - Variação relativa da R_{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos.

Além disso, um parâmetro adicional é utilizado para atestar o reconhecimento biológico realizado por T-PTA. Por meio do percentual de quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) obtemos informações complementares sobre o preenchimento dos sítios de ligação do sensor após a aderência microbiana, como segue:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT(plat)}}{R_{CT(mic)}} \quad \text{Eq. 26}$$

onde $R_{CT(plat)}$ é a resistência à transferência de elétrons da camada MBA_Fe₃O₄@Au-APTES_T-PTA e $R_{CT(mic)}$ são os valores de R_{CT} após a exposição a bactérias e leveduras. Conforme observado na Fig. 34, os valores de θ aumentam proporcionalmente à concentração microbiana avaliada definida em UFC.mL⁻¹. Os dados fornecidos pelo ΔR_{CT} e θ destacam o preenchimento da camada de biorreconhecimento por todas as amostras microbianas, além de exibir respostas eletroquímicas específicas com base em características estruturais na parede celular de bactérias e leveduras.

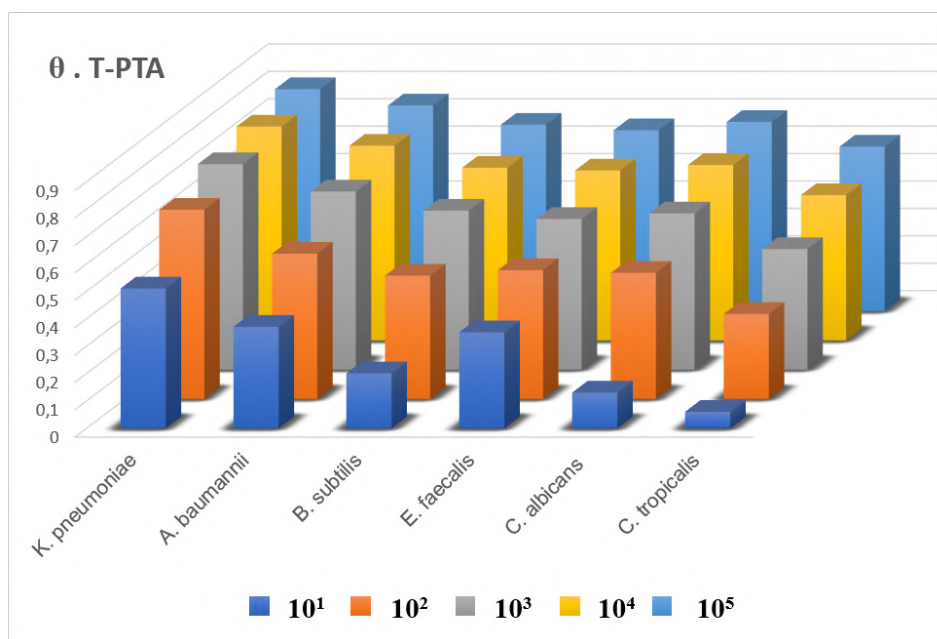


Figura 34 - Quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) após exposição a diferentes espécies de microrganismos em diferentes concentrações (10^1 - 10^5 UFC mL⁻¹).

A literatura destaca que a interação AMP-microrganismo é realizada inicialmente por meio de uma forte interação eletrostática, onde tais AMPs são caracterizados por apresentarem uma carga líquida positiva que é ativamente atraída para a membrana carregada negativamente das células microbianas devido à presença de fosfolípidios aniônicos, fosfatidilglicerol (PG) e cardiolipina (LEE; N. HALL; AGUILAR, 2015). Em bactérias Gram-positivas, o LTA ligado à camada de peptidoglicano é uma estrutura rica em carboxila e fosfato, atributos que promovem um caráter aniônico superficial. Em contraste, as membranas fúngicas apresentam constituição fosfolipídica zwitteriônica associada ao ergosterol, resultando em uma superfície relativamente neutra, dificultando a interação com o AMP (MALANOVIC; LOHNER, 2016). Além disso, a fase seguinte de interação microbiana com AMPs depende da permeabilização da membrana, onde o AMP adquire uma conformação α -hélice anfipática (no caso do T-PTA e na maioria dos AMPs estudados até agora) após o contato com o agente bacteriano/fúngico alvo, levando à perda do potencial transmembrana e inserção consecutiva da membrana microbiana interna (LEE; N. HALL; AGUILAR, 2015).

É perceptível que o tempo de incubação usado para avaliar a adesão dos microrganismos à camada de detecção T-PTA no eletrodo de trabalho foi definido para 5 minutos. O tempo escolhido foi relacionado ao rompimento da membrana e consequentemente a perda da integridade da membrana e a perda do conteúdo citoplasmático, resultado de uma interação prolongada do T-PTA com as células-alvo, levando à perda do R_{CT} na interface eletrodo-eletrólito. Assim, trazendo as características de interação peptídeo-microrganismo mencionadas para os resultados eletroquímicos obtidos pelo biossensor desenvolvido, pode-se destacar a capacidade do peptídeo T-PTA em detectar e relativamente discriminar entre bactérias Gram-positivas e negativas e reconhecer células de leveduras, onde a alta afinidade para células Gram-negativas, como esperado, foi manifestada.

5.3. Sensor Synoeca-MP

O esquema de montagem da plataforma sensora baseada no sistema Synoeca-MP pode ser observada na Fig. 35.

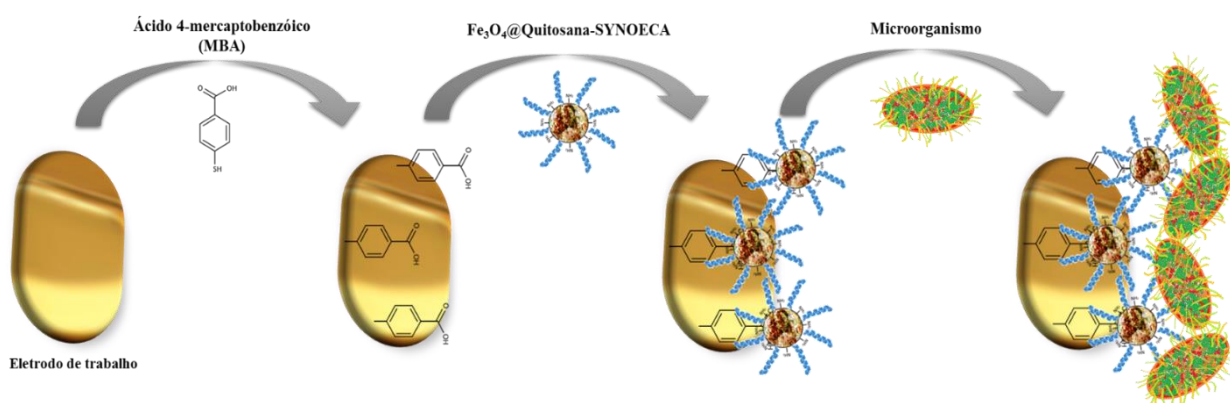


Figura 35 – Representação esquemática da montagem do sistema sensor MBA_ $Fe_3O_4@Quit$ -SynoMP.

5.3.1. Análise morfológica

A imobilização dos componentes do biossensor no ET foi inicialmente avaliado pela AFM. A Fig. 36a mostra o ET modificado com MBA, onde observamos a mudança da superfície lisa devido à formação da MAM com diâmetro de 18 nm. Trabalhos anteriores relataram resultados semelhantes (COSTA et al., 2014; PENSA et al.,

2012). Após a adsorção de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$ (Fig. 36b), pode-se observar a área bem dispersa com nanopartículas, com rugosidade superficial de 64 nm (ANDRADE et al., 2015).

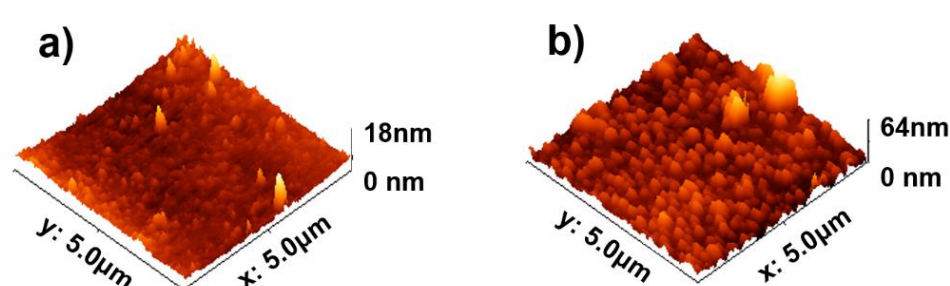


Figura 36 – Análise topográfica dos componentes do sistema sensor $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$ via AFM. a) MBA, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$.

5.3.2. Caracterização eletroquímica da plataforma sensora

As respostas via CV e EIS podem ser observadas na Fig. 37. A Fig. 37a mostra os gráficos de CV dos picos de redução/oxidação obtidos após a deposição de cada componente do biossensor. A sonda redox revelou um comportamento reversível de picos redox da superfície limpa do ET (Fig. 37a, curva preta), onde após adsorção de MBA na superfície do ouro, levou à diminuição da corrente (Fig. 37a, curva vermelha), onde a criação da MAM dificultou a interação do par redox na superfície do eletrodo.

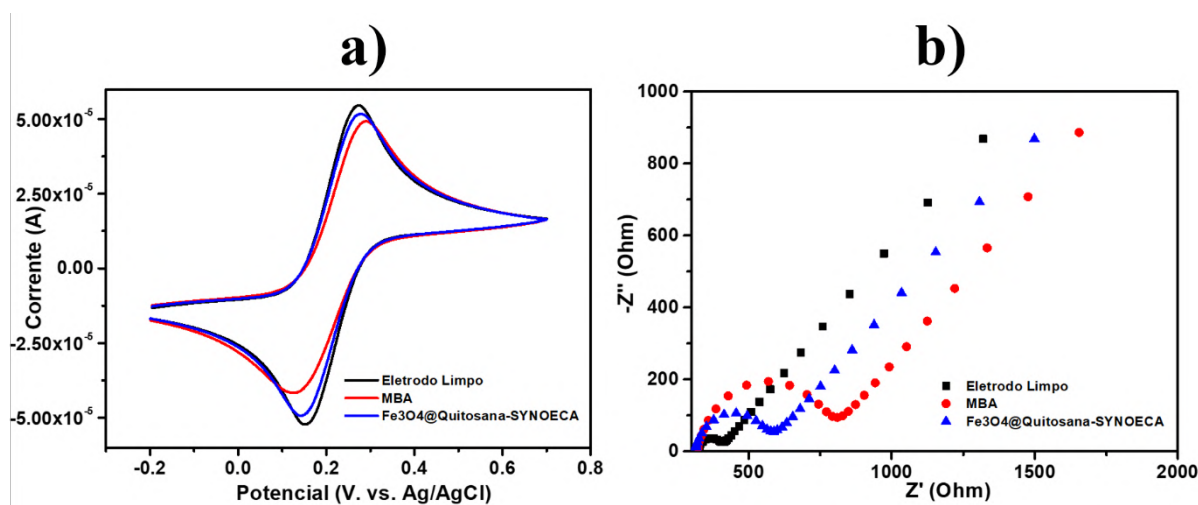


Figura 37 – Análise voltamétrica (a) e impedimétrica (b) da montagem da plataforma sensora $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$.

Após a ligação de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$ à camada de MBA conduzida pela química EDC/NHS (Fig. 37a, curva azul), um aumento na corrente de pico e diminuição no pico a pico separação foi obtida. Isso é provavelmente devido à ativação dos grupos carboxílicos terminais carregados negativamente ($-\text{COOH}$) de MBA então substituídos por ésteres-NHS intermediários que geraram uma superfície de eletrodo carregada positivamente (VAISOCHEROVÁ et al., 2008). Assim, as interações eletrostáticas entre o mediador redox e o éster-NHS resultaram em mudanças nas respostas elétricas. Além disso, o éster-NHS deve interagir com grupos amina da nanopartícula funcionalizada com quitosana, garantindo a obtenção de superfícies de detecção $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$.

Conforme observado na Fig. 37b, as medidas impedimétricas apresentam uma concordância perceptível com as análises voltamétricas, onde os espectros de impedância foram analisados em termos de R_{CT} . Um espectro impedimétrico típico para o ET limpo é mostrado na Fig. 37b (curva preta) $R_{CT} = 0,109 \text{ k}\Omega$. A funcionalização da superfície de trabalho do ET com monocamada de MBA (Fig. 37b, curva vermelha) levou ao bloqueio da transferência de elétrons, dificultando a penetração da sonda redox. Este evento resulta em um aumento significativo da resistência, com $R_{CT} = 1,42 \text{ k}\Omega$. Como esperado, após a ativação $-\text{COOH}$ fornecida pelos agentes de acoplamento EDC/NHS e imobilização das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit-SynoMP}$ (Fig. 37b, curva preta), uma diminuição no diâmetro do semicírculo foi obtida, com $R_{CT} = 0,352$. Além disso, conforme observado na mesma etapa em CV, o éster-NHS formado e a condutividade relativa das nanopartículas favoreceu a transferência de elétrons (SAXENA; SRIVASTAVA, 2019).

5.3.3. Detecção dos microrganismos alvo

Os eventos de ligação do biossensor modificado pelo peptídeo foram confirmados pela verificação da imobilização microbiana via EIS, onde os alvos foram compostos por espécies de *Candida*, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As medições de impedância faradaica são mostradas na Fig. 38 a-f.

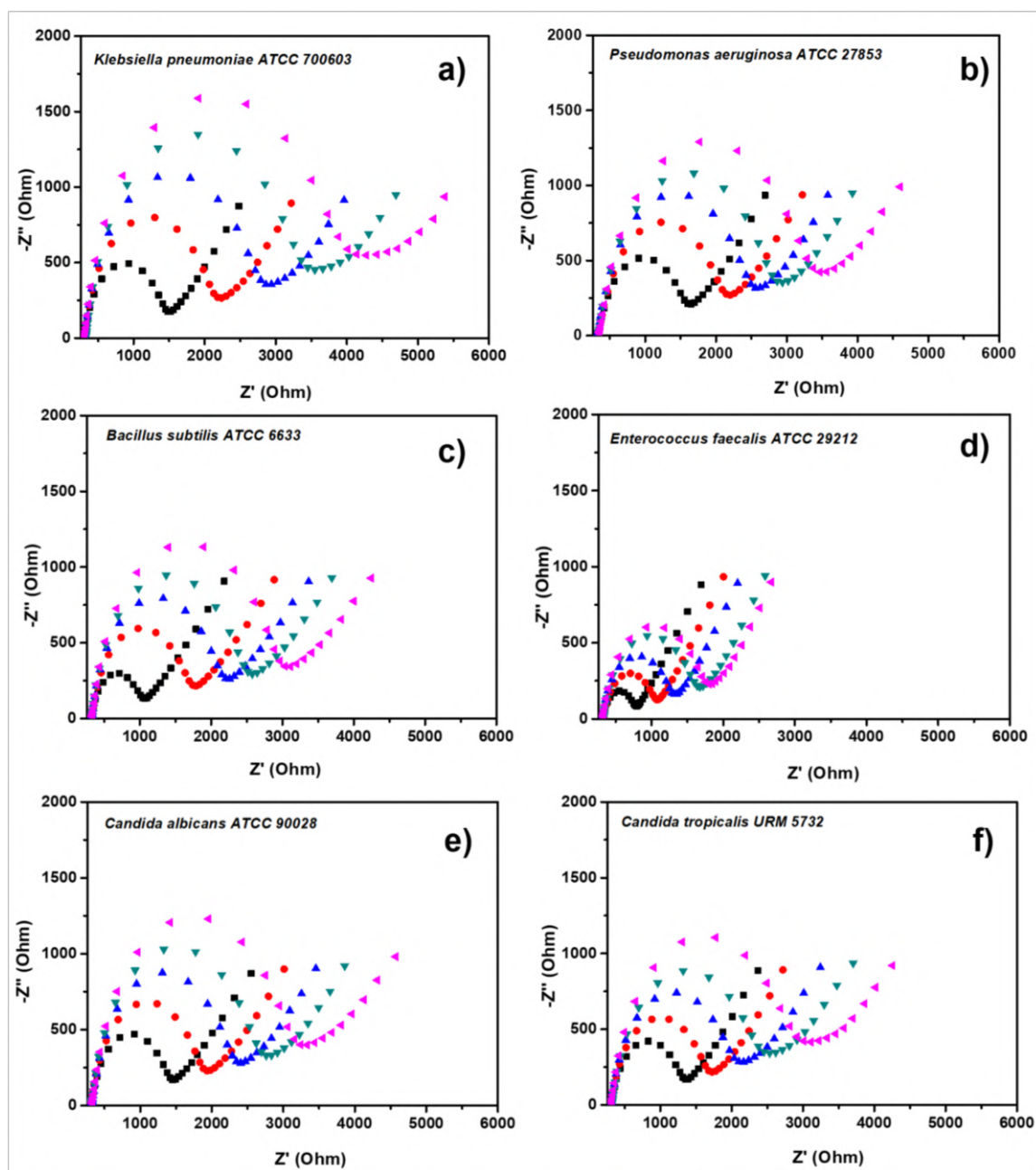


Figura 38 – Resposta impedimétrica da interação da plataforma biossensora frente a diferentes espécies de microrganismos. ■ 10^1 UFC.mL, ● 10^2 UFC.mL, ▲ 10^3 UFC.mL, ▼ 10^4 UFC.mL, ◀ 10^5 UFC.mL.

Importante destacar que a variação do semicírculo localizado em domínios de alta frequência traz informações essenciais sobre o analito detectado. Esta área corresponde ao mecanismo de transferência de carga interfacial onde podemos obter os valores da R_{CT} que revelaram números crescentes, aumentando proporcionalmente à concentração bacteriana/fúngica.

Uma vez que os dados EIS foram coletados, o modelo de circuito equivalente de Randles foi aplicado. A Tabela 6 destaca os valores obtidos dos elementos do circuito de Randles após a detecção de bactérias e fungos. O biossensor mostra uma relação linear entre a variação do R_{CT} e a concentração de microrganismos, variando de 10^1 a 10^5 UFC mL⁻¹, conforme observado nos valores do coeficiente de correlação na Figura 38 a-f.

Tabela 6 - Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma MBA_Fe₃O₄@Quit-SynoMP.

Eletrodo Modificado	CFU mL ⁻¹	R_{CT} (k Ω)	CPE (μ F)	R_s	W
Plataforma Syno-MP	-	0,352	1,21	0,303	0,833
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10^1	1,18	0,963	0,314	0,650
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10^2	1,90	0,920	0,320	0,672
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10^3	2,44	0,821	0,320	0,609
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10^4	3,04	0,777	0,318	0,553
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	10^5	3,76	0,754	0,328	0,491
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10^1	1,22	1,17	0,346	0,658
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10^2	1,76	1,09	0,346	0,676
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10^3	2,13	0,955	0,336	0,634
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10^4	2,45	0,930	0,345	0,624
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10^5	2,97	0,944	0,359	0,600
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10^1	0,758	1,49	0,319	0,845
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10^2	1,43	0,987	0,328	0,813
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10^3	1,88	0,862	0,326	0,803
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10^4	2,21	0,806	0,326	0,794
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	10^5	2,68	0,767	0,334	0,776
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10^1	1,00	0,675	0,324	0,722
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10^2	1,34	0,663	0,323	0,673
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10^3	1,65	0,598	0,327	0,630
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10^4	1,97	0,582	0,329	0,552
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10^5	2,27	0,557	0,330	0,495
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10^1	0,996	1,24	0,314	0,740
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10^2	1,34	1,05	0,313	0,674
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10^3	1,68	0,911	0,313	0,554
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10^4	2,05	0,871	0,324	0,488
<i>C. tropicalis</i> URM 5732	10^5	2,53	0,818	0,319	0,466
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10^1	1,14	1,10	0,318	0,870
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10^2	1,61	0,949	0,313	0,854
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10^3	2,04	0,875	0,324	0,834
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10^4	2,42	0,839	0,318	0,811
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	10^5	2,91	0,793	0,330	0,717

O sistema com Syno-MP revela maior resposta impedimétrica para as bactérias Gram-negativas, apresentando o seguinte padrão: *K. pneumoniae* > *P. aeruginosa* > *C. albicans* > *B. subtilis* > *C. tropicalis* > *E. faecalis*. Estes resultados indicam que a afinidade do peptídeo Syno-MP é maior para espécies Gram-negativas, levando a um aumento da resistividade interfacial do eletrodo. Peptídeos com atividade antimicrobiana ganharam um lugar de destaque na área de biossensores devido à sua capacidade de se ligar a microrganismos com base em sua composição estrutural (QIAO et al., 2020). É estabelecido que os AMPs apresentam uma superfície policatiônica associada à sua conformação anfifílica única após o contato com a membrana externa da célula microbiana, onde essas propriedades variam de acordo com a sequência de aminoácidos (LEI et al., 2019).

Uma vez que a superfície microbiana apresenta uma natureza aniônica inerente, ocorre uma forte interação eletrostática inicial com AMPs. O mecanismo de interação bem aceito com espécies Gram-negativas se deve à camada de lipopolissacarídeo (LPS) carregado negativamente, enquanto as bactérias Gram-positivas oferecem uma superfície aniônica devido ao conteúdo de ácido lipoteicoico (LTA) (LEI et al., 2019; MALANOVIC; LOHNER, 2016). Além disso, a superfície carregada negativa de fungos está associada a fosfomananas ou constituintes análogos presentes na composição estrutural da maioria dos fungos (IBEAS et al., 2000). Quando comparados aos elementos tradicionais de biorreconhecimento como enzimas e anticorpos, os AMPs surgem como ferramentas de biodetecção promissoras por apresentarem facilidade de manuseio, síntese e estabilidade em múltiplas condições químicas (PARDOUX et al., 2019).

Embora a interação dos AMPs com células fúngicas e o mecanismo de ação não tenham sido totalmente elucidados, sugere-se que sejam semelhantes aos observados em bactérias, onde a permeabilização da membrana fúngica poderia perturbar a integridade do conteúdo lipídico (CHO; LEE, 2011). No entanto, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio promovido por esses peptídeos, tais como SynoMP, ao penetrar na bicamada da membrana ou interagir com β -1,3-glucano (um polissacarídeo abundante na parede celular fúngica) também pode levar a um processo apoptótico (WANG et al., 2015).

O desempenho do biossensor funcionalizado com Syno-MP foi avaliado através da variação relativa da resistência de transferência de elétrons (ΔR_{CT}), como descrito pela Equação 24.

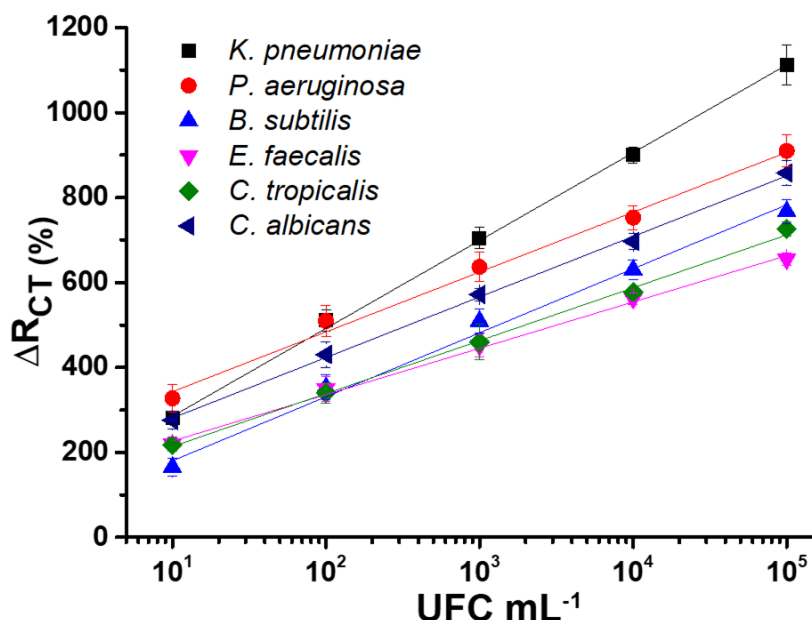


Figura 39 - ΔR_{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos

Conforme observado na Fig. 39, há uma relação linear entre o ΔR_{CT} e a concentração microbiana alvo. Esses diferentes padrões de identificação microbiana ocorreram possivelmente devido às características estruturais dos microrganismos por Syno-MP, onde maiores valores de ΔR_{CT} foram obtidos para *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Seguindo esta perspectiva, a camada de detecção Syno-MP deve ser atraente para detecção de espécies Gram-negativas.

5.4. Sensor Concanavalina A

O processo de montagem da plataforma biossensora baseada na lectina ConA revestindo diferentes nanopartículas está demonstrada na Fig. 40.

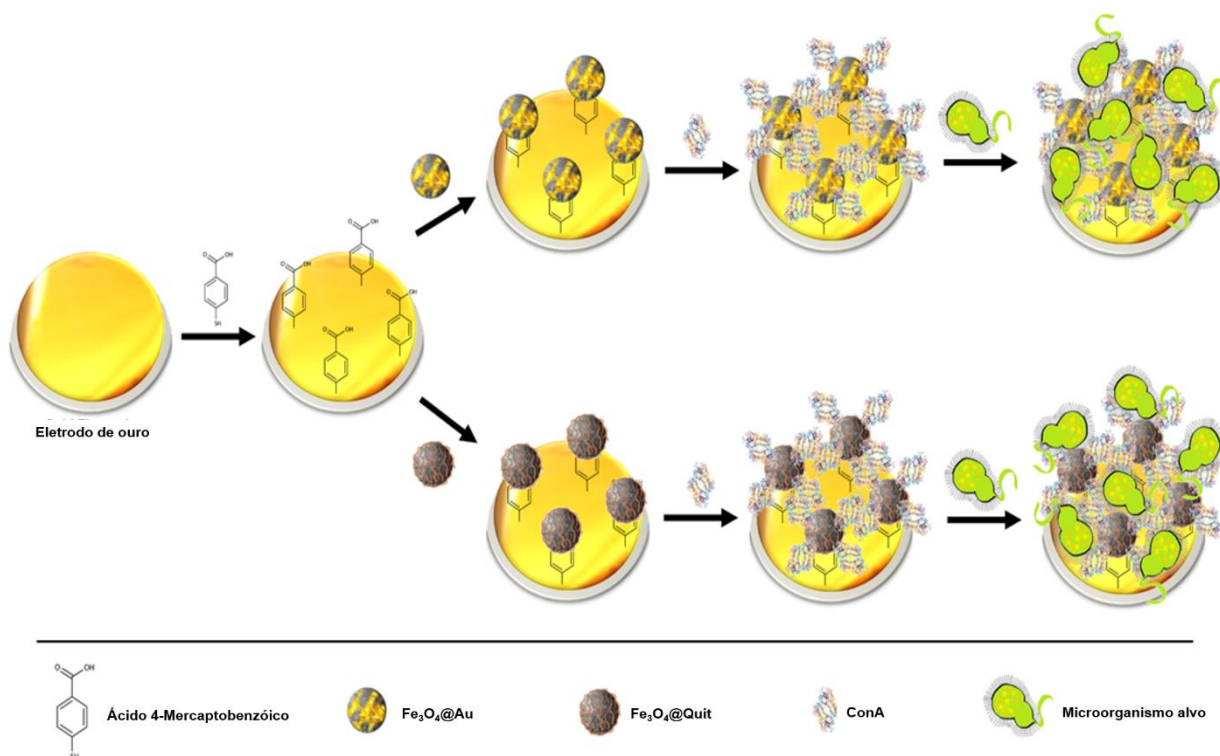


Figura 40 – Ilustração do processo de montagem dos sistemas sensores funcionalizados com a lectina ConA.

5.4.1. Análise morfológica da plataforma sensora MBA_Fe₃O₄@Au_ConA e MBA_Fe₃O₄@Quit_ConA

Os componentes do sistema sensor ConA foram inicialmente avaliados via AFM (Fig. 41). Após a adsorção do MBA no eletrodo de ouro, na Fig. 2a observa-se uma superfície lisa e homogênea devido à formação de uma MAM. Valores de altura de 16 nm estão de acordo com trabalhos anteriores (COSTA et al., 2014; PENSA et al., 2012). Posteriormente, a imobilização covalente de Fe₃O₄@Au-APTES (Fig. 41b) e Fe₃O₄@Quit (Fig. 41c), resultou no aumento de altura 36 nm e 80 nm, respectivamente, demonstrando uma superfície relativamente homogênea. Finalmente, após a imobilização do ConA, foi obtida uma alteração na rugosidade do sistema Fe₃O₄@Au-APTES e Fe₃O₄@Quit, onde o relevo da plataforma aumentou para 41 nm (Fig. 41d) e 85 nm (Fig. 41e), respectivamente.

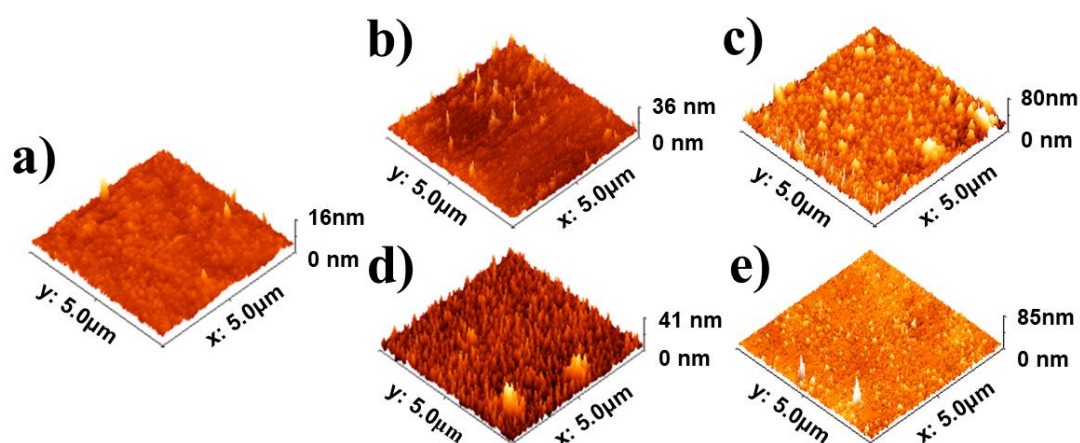


Figura 41 – Imagens topográficas 3D (5.0 μm x 5.0 μm) dos componentes da plataforma sensora avaliados via AFM. a) MBA, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES}$, c) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit}$, d) $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES_ConA}$, e) $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit_ConA}$.

Em ambas as plataformas, a imobilização de ConA resultou em um aumento de altura de aproximadamente 5 nm; esses resultados são corroborados por estudos anteriores (ANDRADE et al., 2015; SÁ et al., 2020). A interação dos biossensores foi confirmada para todas as amostras bacterianas. As imagens são mostradas na Fig. 42 a-f. A interação específica com todas as bactérias resultou em um aumento notável nas mudanças de altura e topografia. Esses dados indicam que o sensor foi capaz de reconhecer todas as bactérias.

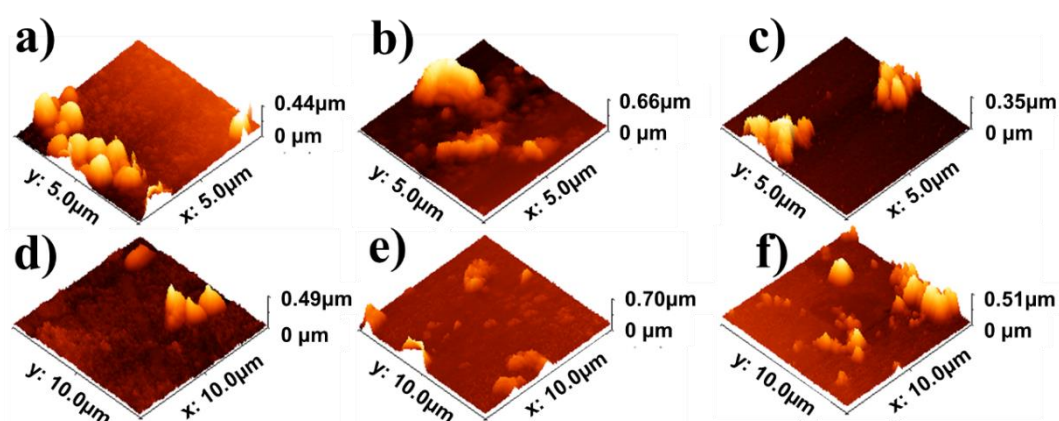


Figura 42 – Imagens topográficas obtidas via AFM para os sensores após interação com microrganismos. Plataforma $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au_ConA}$: (a) *K. pneumoniae* ATCC 700603; (b) *B. subtilis* ATCC 6633; (c) *E. faecalis* ATCC 29212. Plataforma $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Quit_ConA}$: (c) *K. pneumoniae* ATCC 700603; (d) *B. subtilis* ATCC 6633; (e) *E. faecalis* ATCC 29212.

5.4.2. Caracterização eletroquímica das plataformas

A Fig. 43 mostra a caracterização via VC e EIS das duas plataformas estudadas em dois eletrodos distintos. Os picos anódicos e catódicos da VC revelaram mudanças expressivas nos voltamogramas durante a funcionalização do eletrodo (Fig. 43 a-b). Ao mesmo tempo, as reações redox reversíveis indicam que as plataformas são mantidas inalteradas após uma varredura potencial. A voltametria cíclica revelou que as respostas do ET limpo são bem definidas, apresentando um eletrodo limpo e condutor e uma separação pico a pico (ΔE_p) de 114,75 mV. Pode-se observar uma diminuição acentuada em ambos os picos de corrente depois que o ET foi exposto à solução de MBA, resultando na formação de MAM promovidas pela interação ouro-tiol (Au-S) (XUE et al., 2014).

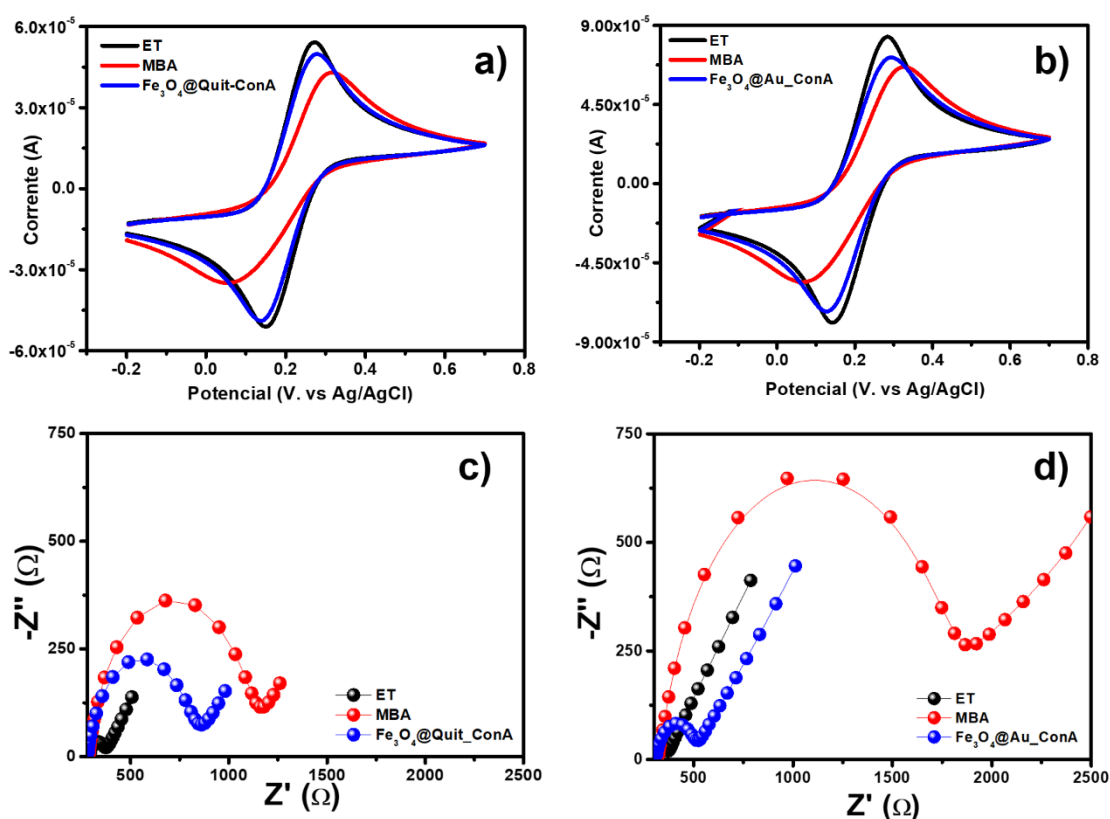


Figura 43 – Análise voltamétrica e impedimétrica do sistema sensor $\text{Fe}_3\text{O}_4@Quit_ConA$ (a) e (c), $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au_ConA$ (b) e (d).

Embora bem embaladas, as moléculas de MBA servem como espaçadores e criam caminhos estáveis para a motilidade do par redox, uma vez que picos bem

definidos ainda são visíveis, melhorando assim o desempenho do biossensor (GONZÁLEZ et al., 2014). Notamos que as respostas amperométricas aumentam após a imobilização dos sistemas nanoestruturados $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit_ConA}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au_ConA}$, indicando assim a fixação bem-sucedida dos sistemas nanoparticulados. Embora fosse esperado que ConA impedisse ainda mais os íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ de sofrer reação redox na superfície do eletrodo, o aumento na condutividade demonstra que a nanoestruturação oferece recursos de transdução aprimorados (KATZ, 2019).

EIS foi usada para caracterizar as plataformas durante seu processo de montagem, analisando sua resposta elétrica pelos diagramas de Nyquist apresentados nas Fig. 43c e 43d. Todas as respostas exibiram um semicírculo seguido por uma linha inclinada (45°) em frequências mais altas. Assim, todos os espectros de impedância foram matematicamente ajustados ao circuito equivalente de Randles, que simula a interação interfacial da superfície do eletrodo e a sonda redox.

Sendo um dos principais parâmetros utilizados em análises eletroquímicas, os sinais analíticos de R_{CT} são diretamente proporcionais à massa depositada sobre o eletrodo de ouro durante a construção do biossensor (RAM et al., 2016). A caracterização começa com a resposta do ET puro após o processo de limpeza. O ET exibe um semicírculo quase inexistente com uma grande difusão Warburg governando o espectro. Este comportamento é característico de superfícies de metal limpas, onde a cinética de difusão da sonda redox é irrestrita sobre o eletrodo planar.

Após a quimissorção do MBA, a resistência interfacial aumentou amplamente como uma indicação clara da formação de sua monocamada, e as diferenças de magnitude entre os eletrodos são simplesmente causadas por diferenças de tamanho de área. O resultado mais marcante vem após a imobilização dos transdutores nanoestruturados. Por exemplo, a imobilização covalente de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au_ConA}$ resultou em uma resistência muito menor do que $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit_ConA}$. Uma clara corroboração dos resultados obtidos por voltametria cíclica em relação ao aumento da condutividade da plataforma hierarquizada $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$.

5.4.3. Análise eletroquímica do biossensor frente a microrganismos

No que diz respeito aos elementos do circuito de Randles avaliados dos espectros impedimétricos pós interação com microrganismos, enquanto o CPE/Q está intrinsecamente associado a variações da área ativa do biossensor, como a espessura da DCE, o R_{CT} carrega informações sobre mudanças superficiais relacionadas à cinética prejudicada da sonda redox após a interação biossensor-alvo (CÓRDOBA-TORRES; MESQUITA; NOGUEIRA, 2015). Tais dados do circuito equivalente estão descritos na Tabela 7, cujos resultados indicam que as plataformas puderam detectar 3 diferentes espécies de microrganismos em diferentes concentrações, seguindo o crescimento dos valores de R_{CT} .

Tabela 7 - Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pelas plataformas com $Fe_3O_4@Quit_ConA$ e $Fe_3O_4@Au_ConA$.

Eletrodo modificado	CFU mL ⁻¹	R_{CT} (k Ω)	CPE (μ F)	R_s	W
$Fe_3O_4@Quit_ConA$	-	0.19	1.23	0.31	0.85
<i>K. pneumoniae</i>	10 ¹	0.72	2.07	0.30	1.33
<i>K. pneumoniae</i>	10 ²	1.10	1.73	0.279	1.32
<i>K. pneumoniae</i>	10 ³	1.52	1.62	0.276	1.25
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁴	1.85	1.53	0.278	1.21
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁵	2.29	1.46	0.278	1.16
<i>B. subtilis</i>	10 ¹	0.91	1.35	0.277	1.4
<i>B. subtilis</i>	10 ²	1.45	1.19	0.28	1.31
<i>B. subtilis</i>	10 ³	1.97	1.13	0.279	1.22
<i>B. subtilis</i>	10 ⁴	2.35	1.09	0.277	1.12
<i>B. subtilis</i>	10 ⁵	2.70	1.10	0.28	1.09
<i>E. faecalis</i>	10 ¹	1.23	1.81	0.287	1.48
<i>E. faecalis</i>	10 ²	1.65	1.55	0.271	1.37
<i>E. faecalis</i>	10 ³	1.98	1.37	0.279	1.27
<i>E. faecalis</i>	10 ⁴	2.45	1.33	0.28	1.13
<i>E. faecalis</i>	10 ⁵	2.87	1.23	0.292	1.06
$Fe_3O_4@Au_ConA$	-	0.553	1.47	0.281	1.45
<i>K. pneumoniae</i>	10 ¹	0.366	0.718	0.321	0.744
<i>K. pneumoniae</i>	10 ²	0.481	0.661	0.314	0.651
<i>K. pneumoniae</i>	10 ³	0.585	0.645	0.315	0.573
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁴	0.672	0.636	0.315	0.508
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁵	0.782	0.637	0.315	0.472
<i>B. subtilis</i>	10 ¹	0.567	1.16	0.324	0.559
<i>B. subtilis</i>	10 ²	0.924	0.918	0.322	0.502
<i>B. subtilis</i>	10 ³	1.39	0.798	0.334	0.458
<i>B. subtilis</i>	10 ⁴	1.87	0.688	0.332	0.445
<i>B. subtilis</i>	10 ⁵	2.35	0.647	0.338	0.437
<i>E. faecalis</i>	10 ¹	0.763	0.876	0.303	0.769
<i>E. faecalis</i>	10 ²	1.44	0.802	0.296	0.586
<i>E. faecalis</i>	10 ³	1.97	0.745	0.301	0.501
<i>E. faecalis</i>	10 ⁴	2.56	0.715	0.297	0.44
<i>E. faecalis</i>	10 ⁵	3.1	0.713	0.303	0.416

Por outro lado, notamos que os valores referentes à CPE diminuem apenas em uma extensão muito limitada. Este efeito está associado à redução da área de superfície efetiva do eletrodo em ambas as plataformas (SAXENA; SRIVASTAVA, 2019). O desempenho das plataformas foi avaliado considerando a ΔR_{CT} , conforme descrito na Equação 24.

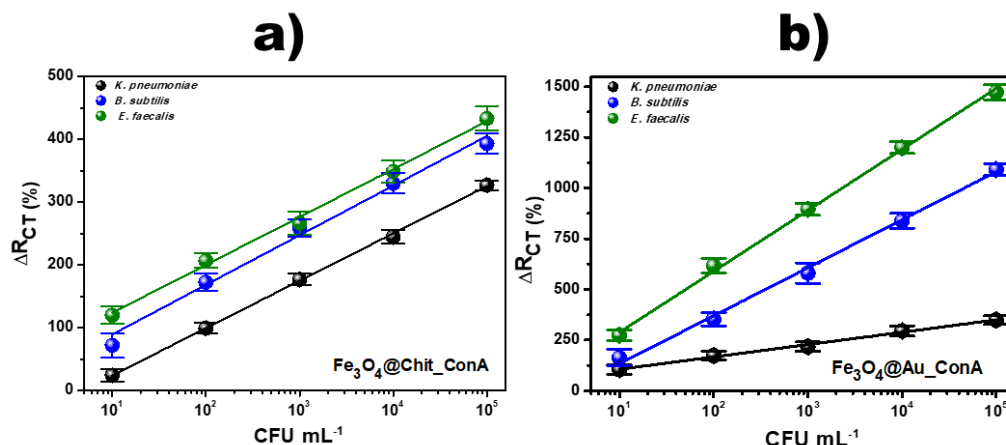


Figura 44 - ΔR_{CT} do sistema sensor $Fe_3O_4@Chit_ConA$ (a) e $Fe_3O_4@Au_ConA$ (b) após exposição a diferentes espécies de microrganismos.

As Fig. 44a e 44b mostram ΔR_{CT} em porcentagem em relação à aderência bacteriana na superfície do sensor. Todos os valores encontrados foram diretamente proporcionais às concentrações de UFC mL⁻¹. O limite de detecção foi estimado como igual a $3,3 \sigma/s$, onde σ é o S.D. da interceptação da linha de regressão e 's' é a inclinação da curva de calibração. As curvas de calibração $Fe_3O_4@Chit_ConA$ resultaram nos seguintes valores: *K. pneumoniae*, $\Delta R_{CT} = -51,532 + 32,733 \ln (CFU mL^{-1})$ com um LOD de 0,329; *B. subtilis*, $\Delta R_{CT} = 10,213 + 34,291 \ln (CFU mL^{-1})$ com um LOD de 1,4 e *E. faecalis*, $\Delta R_{CT} = 47,379 + 33,104 \ln (CFU mL^{-1})$ com um LOD de 0,75.

Da mesma forma, curvas de calibração foram calculadas para a plataforma $Fe_3O_4@Au_ConA$ resultando nos seguintes valores: *K. pneumoniae*, $\Delta R_{CT} = 45,806 + 26,424 \ln (CFU mL^{-1})$ com um LOD de 1,02; *B. subtilis*, $\Delta R_{CT} = -102,906 + 102,77 \ln (CFU mL^{-1})$ com um LOD de 0,79 e, finalmente, *E. faecalis*, $\Delta R_{CT} = -12,071 + 130,624 \ln (CFU mL^{-1})$ com um LOD de 0,494. Os LODs obtidos para ambas as plataformas foram inferiores aos necessários para diagnosticar as condições clínicas. As

condições de bacteremia e bacteriúria resultam em até 15 UFC mL⁻¹ e 10²-10⁴ UFC mL⁻¹ no sangue e na urina, respectivamente (PARK et al., 2012; TULLUS, 2019).

Embora tais resultados mostrem uma relação direta entre os valores de ΔR_{CT} e as concentrações bacterianas, as bactérias Gram-positivas foram diferenciadas apenas por Fe₃O₄@Au_ConA, indicando que esta plataforma poderia ser usada como um biossensor quantitativo. Para o mais provável, esses resultados são correlacionados ao tamanho e distribuição física da ConA sobre os transdutores. Por exemplo, após a imobilização de ConA, imagens AFM da plataforma Fe₃O₄@Quit mostram aglomerados espessos em vez da superfície refinada da plataforma Fe₃O₄@Au.

Portanto, devido ao seu tamanho e maior área de superfície, ConA encontrou uma melhor distribuição sobre a superfície do Fe₃O₄@Au, melhorando assim seu contato com a célula bacteriana. Como um estudo adicional, calculamos a porcentagem da área de cobertura do biossensor (θ) conforme descrito na Equação 26.

O parâmetro θ representa a cinética da sonda redox quando os locais de ligação ocupados interrompem a motilidade da sonda redox e, portanto, indica a capacidade de resposta da superfície do biossensor

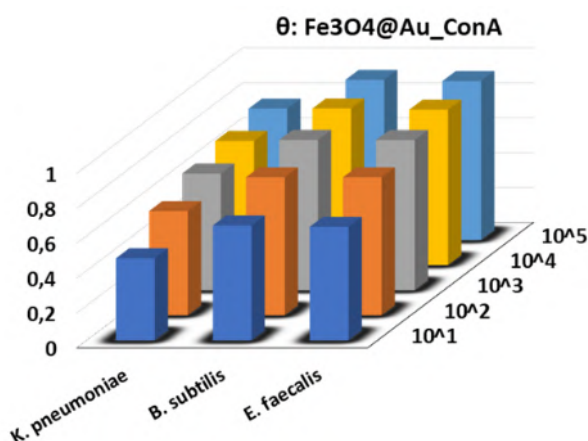


Figura 45 – Quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) após exposição a diferentes espécies de microrganismos em diferentes concentrações (10¹-10⁵ UFC mL⁻¹).

Conforme observado na Fig. 45, os valores de θ aumentam imediatamente a partir da concentração mais baixa (10¹), e o preenchimento da plataforma sensora começa a saturar em 10⁴. Considerando que as concentrações da amostra aumentam

logaritmicamente, esses resultados mostram que o biossensor $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au_ConA}$ hierarquizado gera significativamente mais sinais em todas as concentrações de amostra e, portanto, os excelentes limites de detecção obtidos.

ConA e outras lectinas têm sido usadas para interagir com carboidratos e glicoproteínas específicas em estruturas celulares distintas, como aquelas expressas em células cancerosas quando comparadas com células saudáveis (Chowdhury et al., 2018), implementadas em reconhecimento microbiano (ZHENG et al., 2017), e detecção de vírus (SIMÃO et al., 2020).

A parede celular bacteriana é construída principalmente de peptidoglicano (cadeias reticuladas de GlcNAc e ácido N-acetilmurâmico). De acordo com sua espessura e arquitetura específica, as bactérias podem ser classificadas em dois grupos principais já bastante elucidados: Gram-negativas e Gram-positivas (AHMED et al., 2014). As bactérias Gram-negativas têm uma camada externa de LPS composta por lipídeo A (uma porção de dissacarídeo GlcN-GlcN) e antígeno O (um oligossacarídeo com unidades 'O' repetidas) cuja variabilidade na estrutura e composição concede resposta imunológica específica (CAROFF; KARIBIAN, 2003).

Por outro lado, as bactérias Gram-positivas contam com uma camada mais espessa de peptidoglicano (até 30 nm em comparação aos 10 nm em bactérias Gram-negativas) e um equivalente ao LPS composto de ácido lipoteicoico (LTA) (HERGET et al., 2008). Desta forma, a atividade de ligação a carboidratos da ConA foi explorada para interagir com sacarídeos e glicoconjugados na superfície de células bacterianas.

Os resultados sugerem que a adesão de bactérias às camadas de biossensor de ConA formam complexos lectina-bactéria que se comportam como obstáculos físicos ao par redox, impedindo-o de atingir a superfície do eletrodo e consequentemente aumentando a R_{CT} . Diversos padrões de resposta são obtidos de acordo com o número de células imobilizadas, dependendo de sua combinação específica de sacarídeos de membrana e de como eles interagem com ConA. No entanto, embora a interação seja formada, às vezes o processo de biorreconhecimento não pode ser manipulado pelo transdutor, mesmo quando a composição da membrana tem pequenas diferenças entre os alvos, os sinais obtidos podem se sobrepor evitando uma discriminação correta. Por esse motivo, alguns

relatórios chamam a atenção para o uso de compostos nanoestruturados hierarquizados como alternativa para superar essas desvantagens (HE et al., 2016; LEE et al., 2018).

Em adição, os resultados estão de acordo com estudos anteriores que descobriram que nanoestruturação refinada (ou seja, hierarquização) com nanoestruturas menores sobre outra nanopartícula aumentam a resposta transduzida (THAMILSELVAN et al., 2019; ZHOU et al., 2012). Assim, elementos de biorreconhecimento específicos atualmente desconsideradas para a detecção de bactérias Gram-positivas, como a ConA, têm suas habilidades de biorreconhecimento aprimoradas.

Assim, a decoração das nanopartículas de Fe_3O_4 com ouro parece ser mais eficiente do que as nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com quitosana, visto que nanopartículas de ouro são e menores aumentam o desempenho da transferência de elétrons. Dessa forma, além de conferir alta sensibilidade, a hierarquização de nanoestruturas é uma abordagem relevante para melhorar a resposta elétrica em processos de biorreconhecimento.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foram desenvolvidas diferentes plataformas biossensoras eletroquímicas para a detecção de microrganismos de interesse clínico, onde peptídeos antimicrobianos e uma lectina foram utilizados como elemento de biorreconhecimento. Os peptídeos (ClavA, Syno-MP e T-PTA) e lectina (ConA) foram imobilizados na superfície do ouro de um eletrodo de trabalho contendo camadas automontadas de ácido mercaptobenzóico e nanopartículas metálicas que auxiliaram na condução da corrente elétrica na interface eletrodo-solução eletrolítica. As técnicas voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica revelaram o revestimento do eletrodo pelos componentes, mostrando-os aptos para avaliação após interação com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

As quatro estratégias demonstraram uma resposta linear proporcional com o aumento da concentração dos microrganismos, onde a interação ocorreu com a inserção do eletrodo em suspensões microbianas que variavam de 10^1 até 10^6 unidades formadoras de colônia por mL.

No caso dos peptídeos antimicrobianos, a resposta eletroquímica evidenciou diferentes padrões de resposta, onde as características estruturais e de superfície das bactérias e fungos estudados revelaram maior afinidade dos peptídeos frente a bactérias Gram-negativas. Tal feito deve-se a estrutura policatiônica dos AMPs e a superfície eletronegativa dos microrganismos, favorecendo uma forte atração eletrostática inicial, seguida da inserção na bicamada lipídica.

A interação da lectina ConA com bactérias foi favorecida pelos resíduos de Glc e Man no LPS de espécies Gram-negativas e peptidoglicano e LTA de espécies Gram-positivas. Dentre as duas nanopartículas sintetizadas, foi constatado que melhor sinal eletroquímico foi obtido pela $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ devido a seu tamanho e maior área de superfície, onde a lectina encontrou uma melhor distribuição $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, melhorando assim seu contato com a célula bacteriana.

Perspectivas:

- Testes com outras espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;

- Testes com outras espécies de fungos filamentosos e leveduras, dentre eles, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp e *Cryptococcus*, sp., onde relatos indicaram a presença em água de bebedouros coletivos;
- Testes com protozoários, como a *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica*, uns dos principais protozoários causadores de doenças intestinais em água ou alimentos contaminados;
- Dispersar as nanopartículas magnéticas em suspensões com microrganismos e posteriormente, com campo magnético, “pescar” as nanopartículas e imobilizá-las em fios magnetizados, seguido da avaliação eletroquímica. Em adição, tal estratégia seria uma inovadora opção de descontaminação de água, uma vez que os microrganismos ficam inseridos aos peptídeos antimicrobianos e lectinas.

7. REFERÊNCIAS

ABU-THABIT, N. Y. Chemical Oxidative Polymerization of Polyaniline: A Practical Approach for Preparation of Smart Conductive Textiles. **Journal of Chemical Education**, v. 93, n. 9, p. 1606–1611, 2016.

ACHARYA, A. K. **Research Trends in Chemical Sciences**. [s.l.] AkiNik Publications, 2020.

AHMED, A. et al. Biosensors for whole-cell bacterial detection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 631–646, 2014.

AMAL, T. et al. **Development of an electrochemical biosensor for Δ^9 - tetrahydrocannabinol detection based on gold surfaces functionalized with self-assembled monolayers**. Proceedings of MOL2NET 2018, International Conference on Multidisciplinary Sciences, 4th edition. **Anais...**2018

ANDRADE, C. A. S. et al. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 833–839, 2015.

ARISTOV, N.; HABEKOST, A. Cyclic Voltammetry - A Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes. **World Journal of Chemical Education**, v. 3, n. 5, p. 115–119, 2015.

ASIRI, S. M.; KHAN, F. A.; BOZKURT, A. Synthesis of chitosan nanoparticles, chitosan-bulk, chitosan nanoparticles conjugated with glutaraldehyde with strong anti-cancer proliferative capabilities. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup3, p. S1152–S1161, 2018.

AUTOLAB. **Basic overview of the working principle of a potentiostat/galvanostat (PGSTAT) – Electrochemical cell setup** Metrohm Autolab.B.V, 2011.

BALLOUX, F.; VAN DORP, L. Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us? **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 4–9, 2017.

BĂNICĂ, F. G. Electrical Impedance-Based Sensors. In: **Chemical Sensors and**

Biosensors: Fundamentals and Applications. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, INC., 2012. p. 367–403.

BARRE, A. et al. Overview of the structure–Function relationships of mannose-specific lectins from plants, Algae and Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2019.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R. **Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications.** 3. ed. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, INC., 2018.

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930–934, 1986.

BOEV, C.; KISS, E. Hospital-Acquired Infections: Current Trends and Prevention. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 51–65, 2017.

CAI, W. et al. **Electrode Kinetics of Electron-Transfer Reaction and Reactant Transport in Electrolyte Solution.** [s.l.] Elsevier B.V., 2014.

CANDEO, E. DE S. et al. **Biofuels Production – Sustainability and Advances in Microbial Bioresources.** [s.l.] Springer, 2020.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2431–2447, 2003.

CHAPMAN, D. L. A contribution to the theory of electrocapillarity. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 25, n. 145, p. 475–481, 1913.

CHO, J.; LEE, D. G. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. **Biochimie**, v. 93, n. 10, p. 1873–1879, 2011.

CHOI, W. et al. Modeling and applications of electrochemical impedance spectroscopy (Eis) for lithium-ion batteries. **Journal of Electrochemical Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2020.

CHU, T.-X. et al. Molecularly Imprinted Polyaniline Nanowire-Based Electrochemical Biosensor for Chloramphenicol Detection: A Kinetic Study of Aniline

Electropolymerization. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 2, p. 027527, 2020.

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.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3th ed.** Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. Disponível em: <https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf>

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Tenth Ed.** Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CÖRDOBA-TORRES, P.; MESQUITA, T. J.; NOGUEIRA, R. P. Relationship between the origin of constant-phase element behavior in electrochemical impedance spectroscopy and electrode surface structure. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 8, p. 4136–4147, 2015.

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.

COULIBALY, F. S.; YOUAN, B. B. C. Concanavalin A-Polysaccharides binding affinity analysis using a quartz crystal microbalance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 404–411, 2014.

DE MIRANDA, J. L. et al. A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 108–114, 2017.

DHANJAI et al. Voltammetric sensing of biomolecules at carbon based electrode interfaces: A review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 174–189,

2018.

DING, J.; QIN, W. Recent advances in potentiometric biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 124, p. 115803, 2020.

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

DUAY, S. S. et al. Molecular Dynamics Investigation into the Effect of Zinc(II) on the Structure and Membrane Interactions of the Antimicrobial Peptide Clavanin A. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 15, p. 3163–3176, 2019.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental pieuococcus infections in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 70, n. 1, p. 11–18, 1939.

DUNWELL, M.; YAN, Y.; XU, B. Understanding the influence of the electrochemical double-layer on heterogeneous electrochemical reactions. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 20, p. 151–158, 2018.

EBRAHIMINEZHAD, A. et al. Impact of amino-acid coating on the synthesis and characteristics of iron-oxide nanoparticles (IONS). **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, n. 12, p. 3957–3962, 2012a.

EBRAHIMINEZHAD, A. et al. Impact of amino-acid coating on the synthesis and characteristics of iron-oxide nanoparticles (IONS). **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, n. 12, p. 3957–3962, 2012b.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

ENSAFI, A. A. An introduction to sensors and biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 1–10.

ESPINOZA, E. M. et al. Practical Aspects of Cyclic Voltammetry: How to Estimate Reduction Potentials When Irreversibility Prevails. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 5, p. H3175–H3187, 2019.

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.

FISCHER, M. J. E. Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach. In: FISCHER, N. J. M. M. J. E. (Ed.). . **Surface Plasmon Resonance. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. 1. ed. [s.l.] Humana Press, 2010. v. 627p. 55–73.

FRANCO-DUARTE, R. et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, 2019.

FREIRE, D. O. et al. Wasp venom peptide, synoeca-MP, from *Synoeca surinama* shows antimicrobial activity against human and animal pathogenic microorganisms. **Peptide Science**, n. August, p. 1–6, 2019.

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.

GAUTAM, A. K. et al. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 474–483, 2020.

GHORBANI ZAMANI, F. et al. Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 264–276, 2019.

GONG, H. et al. Aggregated Amphiphilic Antimicrobial Peptides Embedded in Bacterial Membranes. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 40, p. 44420–44432, 2020.

GONZÁLEZ, M. C. R. et al. Structure and Electronic and Charge-Transfer Properties of Mercaptobenzoic Acid and Mercaptobenzoic Acid – Undecanethiol Mixed Monolayers on Au (111). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 51, p. 30013–30022, 2014.

GORAKSHAKAR, A. C.; GHOSH, K. Use of lectins in immunohematology. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 10, n. 1, p. 12–21, 2016.

GOTHE, P. K.; GAUR, D.; ACHANTA, V. G. Mptms self-assembled monolayer deposition for ultra-thin gold films for plasmonics. **Journal of Physics Communications**, v. 2, n. 3, 2018.

GOUY, M. Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte. **Journal de Physique Théorique et Appliquée**, v. 9, n. 1, p. 457–468, 1910.

GROSSI, M.; RICCÒ, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review. **Journal of Sensors and Sensor Systems**, v. 6, n. 2, p. 303–325, 2017.

GUARNER, J. Three Emerging Coronaviruses in Two Decades: The Story of SARS, MERS, and Now COVID-19. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 153, n. 4, p. 420–421, 2020.

GUILBAULT, G. G.; MONTALVO, J. G. A Urea-Specific Enzyme Electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164–2165, 1969.

HAMEED, S.; XIE, L.; YING, Y. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. December 2017, p. 61–73, 2018.

HASAN, A.; PANDEY, L. M. Self-assembled monolayers in biomaterials. In: **Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2018. p. 137–178.

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; DE LA GUARDIA, M. **Iron and iron-oxide magnetic nanoparticles as signal-amplification elements in electrochemical biosensing**TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.016>>

HAUPTMANN, N. et al. AFM Imaging of Mercaptobenzoic Acid on Au(110): Submolecular Contrast with Metal Tips. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 7, n. 11, p. 1984–1990, 2016.

HAVELAAR, A. H. et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1–23, 2015.

HE, C. et al. A Highly Sensitive Glucose Biosensor Based on Gold Nanoparticles/Bovine Serum Albumin/Fe₃O₄ Biocomposite Nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 222, p. 1709–1715, 2016.

HELMHOLTZ, H. V. Studien über electrische Grenzsichten. **Annalen der Physik und Chemie**, v. 243, n. 7, p. 337–382, 1879.

HERGET, S. et al. Statistical analysis of the bacterial carbohydrate structure data base (BCSDB): Characteristics and diversity of bacterial carbohydrates in comparison with mammalian glycans. **BMC Structural Biology**, v. 8, n. 35, 2008.

HIRABAYASHI, J. **Lectins: Methods and Protocols**. 1. ed. [s.l.] Humana Press, 2014.

HOANG, T. B. et al. The characterisation and quantification of immobilised Concanavalin A on quartz surfaces based on the competitive binding to glucose and fluorescent labelled dextran. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 2, 2019.

HOSSEINI, S. et al. Advantages, Disadvantages and modifications of conventional ELISA. In: **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**. [s.l.] Springer Singapore, 2017. p. 67–115.

HOYOS-NOGUÉS, M.; GIL, F. J.; MAS-MORUNO, C. Antimicrobial peptides: Powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–24, 2018.

HRONCEKOVA, S. et al. Urine Ultrasensitive Ti₃C₂TX MXene/Chitosan Nanocomposite-Based Amperometric Biosensor for Detection of Potential Prostate Cancer Marker in Urine Samples. **Processes**, v. 8, n. 5, p. 580, 2020.

HUREMOVIĆ, D. Brief History of Pandemics (Pandemics Throughout History). In: **Psychiatry of Pandemics**. [s.l.] Springer, 2019. p. 7–35.

IBEAS, J. I. et al. Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a

plant PR-5 protein. **Plant Journal**, v. 23, n. 3, p. 375–383, 2000.

ISLAM, M. A. et al. Antimicrobial warnericin RK peptide functionalized GaAs/AlGaAs biosensor for highly sensitive and selective detection of *Legionella pneumophila*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 154, n. November, p. 107435, 2020a.

ISLAM, T. et al. Metal Nanoparticles for Electrochemical Sensing: Progress and Challenges in the Clinical Transition of Point-of-Care Testing. **Molecules**, p. 8–13, 2020b.

JAFFREZIC-RENAULT, N.; DZYADEVYCH, S. V. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2569–2588, 2008.

JAKHAR, S.; PUNDIR, C. S. Preparation, characterization and application of urease nanoparticles for construction of an improved potentiometric urea biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, n. July 2017, p. 242–250, 2018.

KATZ, E. Synthesis, Properties and Applications of Magnetic Nanoparticles and Nanowires—A Brief Introduction. **Magnetochemistry**, v. 5, n. 4, p. 61, 2019.

KHADEMI, M.; BARZ, D. P. J. Structure of the Electrical Double Layer Revisited: Electrode Capacitance in Aqueous Solutions. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 36, n. 16, p. 4250–4260, 2020.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017.

KHAN, M. D. et al. Aggravation of human diseases and climate change nexus. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 15, 2019.

KHAN, M. Z. H. Effect of ITO surface properties on SAM modification: A review toward biosensor application. **Cogent Engineering**, v. 3, n. 1, 2016.

KOIKE, K. et al. Characteristics of an extended gate field-effect transistor for glucose sensing using an enzyme-containing silk fibroin membrane as the bio-chemical component. **Biosensors**, v. 10, n. 6, 2020.

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

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.

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

LEE, J. et al. A multi-functional gold/iron-oxide nanoparticle-CNT hybrid nanomaterial as virus DNA sensing platform. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 425–431, 2018.

LEE, T.-H.; N. HALL, K.; AGUILAR, M.-I. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25–39, 2015.

LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 2019.

LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILLNER, P. A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 3, p. 343–362, 2020.

LI, J. et al. Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. FEB, p. 1–18, 2017.

LI, L. et al. Facile and feasible conductometric immunoanalytical assay for alpha-fetoprotein using platinum-functionalized graphitic carbon nitride nanosheets. **Analytical Methods**, v. 10, n. 40, p. 4886–4893, 2018.

LI, Y. et al. Impedance based detection of pathogenic E. coli O157: H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 193–199, 2014.

LIN, Y. et al. A “signal-on” chemiluminescence biosensor for thrombin detection based on DNA functionalized magnetic sodium alginate hydrogel and

metalloporphyrinic metal-organic framework nanosheets. **Talanta**, v. 207, n. August 2019, p. 120300, 2020.

LOPEZ-TELLEZ, J. et al. Impedimetric biosensor based on a hechtia argentea lectin for the detection of salmonella spp. **Chemosensors**, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2020.

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.

MADURAIVEERAN, G.; JIN, W. Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 13, p. 10–23, 2017.

MADURAIVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, n. December 2017, p. 113–129, 2018a.

MADURAIVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, n. December 2017, p. 113–129, 2018b.

MAGANA-ARACHCHI, D. N.; WANIGATUNGE, R. P. Ubiquitous waterborne pathogens. In: **Waterborne Pathogens**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 15–42.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 936–946, 2016.

MASUOKA, J. Surface Glycans of Candida albicans and Other Pathogenic Fungi : Physiological Roles , Clinical Uses , and Experimental Challenges Surface Glycans of Candida albicans and Other Pathogenic Fungi : Physiological Roles , Clinical Uses , and Experimental Chal. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 281–310, 2004.

MAZALOVSKA, M.; KOUOKAM, J. C. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

MBUYA, M. N. N.; HUMPHREY, J. H. Preventing environmental enteric dysfunction through improved water, sanitation and hygiene: An opportunity for stunting reduction in developing countries. **Maternal and Child Nutrition**, v. 12, p. 106–120, 2016.

MI, F. et al. Application of lectin-based biosensor technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria: A review. **Analyst**, v. 146, n. 2, p. 429–443, 2021.

MOHAMED, D. S. et al. Antimicrobial activity of silver-treated bacteria against other multi-drug resistant pathogens in their environment. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, 2020.

MONEGRO, A. F.; MUPPIDI, V.; REGUNATH, H. **Hospital acquired infections Handbook of Pediatric Retinal OCT and the Eye-Brain Connection** StatPearls Publishing, , 2020.

MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 747–767, 2018.

MUÑOZ, J.; MONTES, R.; BAEZA, M. **Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization, architecture surface and bio-sensing** TrAC - Trends in Analytical Chemistry Elsevier B.V., , 1 dez. 2017.

NEETHIRAJAN, S. et al. Recent advancement in biosensors technology for animal and livestock health management. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, n. July 2017, p. 398–407, 2017.

OLIVEIRA, M. et al. Biowarfare, bioterrorism and biocrime: A historical overview on microbial harmful applications. **Forensic Science International**, v. 314, 2020.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PARDOUX, É. et al. Antimicrobial peptide arrays for wide spectrum sensing of pathogenic bacteria. **Talanta**, v. 203, n. January, p. 322–327, 2019.

PARK, S. Y. et al. Clinical significance and outcome of polymicrobial *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Journal of Infection**, v. 65, n. 2, p. 119–127, 2012.

PENSA, E. et al. Are 4-mercaptobenzoic acid self assembled monolayers on Au(111) a suitable system to test adatom models? **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 49, p. 25765–25771, 2012.

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

PITT, T. L. ; BARER, M. R. Classification, identification and typing of micro-organisms. **Medical Mycology**, v. 24, n. 1, 2012.

POHANKA, M. Piezoelectric immunosensor for the determination of C-reactive protein. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 14, n. 9, p. 8470–8478, 2019.

PUIU, M.; BALA, C. Peptide-based electrochemical biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 277–306.

PUROHIT, B. et al. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. **Sensors International**, v. 1, n. July, p. 100040, 2020.

PURTY, R.; CHATTERJEE, S. DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. **Austin J Biotechnol Bioeng. Austin J Biotechnol Bioeng**, v. 3, n. 3, p. 1059–1, 2016.

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

QIAO, Z. et al. Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review. **Food Control**, v. 112, 2020.

RAHMAN, A. T. M. M. et al. Preliminary study on biosensor-type time-temperature integrator for intelligent food packaging. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 6, 2018.

RAJAPAKSHA, P. et al. A review of methods for the detection of pathogenic

microorganisms. **Analyst**, v. 144, n. 2, p. 396–411, 2019.

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

RANNEY, M. L.; GRIFFETH, V.; JHA, A. K. Critical Supply Shortages — The Need for Ventilators and Personal Protective Equipment during the Covid-19 Pandemic Megan. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, 2020.

RAYMUNDO-PEREIRA, P. A. et al. Influence of the Molecular Orientation and Ionization of Self-Assembled Monolayers in Biosensors: Application to Genosensors of Prostate Cancer Antigen 3. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 125, n. 1, p. 498–506, 2021.

REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 11–43.

RIBEIRO, K. L. et al. Impedimetric Clavmo Peptide-Based Sensor Differentiates Ploidy of Candida Species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 167, n. August 2020, 2021.

RIZAL, N. S. M. et al. Advantages and limitations of 16S rRNA next-generation sequencing for pathogen identification in the diagnostic microbiology laboratory: perspectives from a middle-income country. **Diagnostics**, v. 10, n. 10, 2020.

ROMERO, S. M. et al. Temporins: An Approach of Potential Pharmaceutic Candidates. **Surgical Infections**, v. 21, n. 4, p. 309–322, 2020.

ROSSEN, J. W. A.; FRIEDRICH, A. W.; MORAN-GILAD, J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 355–360, 2018.

SÁ, S. R. et al. Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic candida species. **Talanta**, v. 220, n. March, p. 121375, 2020.

SAKELLARI, G. I.; HONDOW, N.; GARDINER, P. H. E. Factors Influencing the Surface Functionalization of Citrate Stabilized Gold Nanoparticles with Cysteamine, 3-Mercaptopropionic Acid or L-Selenocystine for Sensor Applications.

Chemosensors, v. 8, n. 3, p. 80, 2020.

SALEHIZADEH, H. et al. Synthesis and characterization of core-shell Fe₃O₄-gold-chitosan nanostructure. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 3, p. 1–7, 2012.

SANDHYARANI, N. Surface modification methods for electrochemical biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 45–75.

SANI, U. S. Circuit Elements Used in Electrochemistry. **The Journal of Science, Technology And Humanities**, v. 2, n. 2, p. 18–21, 2016.

SAXENA, R.; SRIVASTAVA, S. An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 297, n. 15, p. 126780, 2019.

SCHMICKLER, W.; SANTOS, E. **Interfacial Electrochemistry**. 2. ed. [s.l.] Springer, 2010.

SCHOLZ, F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. **ChemTexts**, v. 1, n. 4, p. 17, 2015.

SCHWAMINGER, S. P.; SYHR, C.; BERENSMEIER, S. Controlled synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: Magnetite or maghemite? **Crystals**, v. 10, n. 3, 2020.

SCOTT, K. **Sustainable and Green Electrochemical Science and Technology**. 1. ed. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, 2017.

SEYFI, R. et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451–1463, 2020.

SHARMA, N. K. et al. Impedimetric sensors: Principles, applications and recent trends. **International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering**, v. 8, n. 10, p. 4015–4025, 2019.

SHI, X. et al. Atomic force microscopy - Scanning electrochemical microscopy (AFM-SECM) for nanoscale topographical and electrochemical characterization: Principles,

applications and perspectives. **Electrochimica Acta**, v. 332, 2020.

SHIN, J. et al. Economic impact of the first wave of the COVID-19 pandemic on acute care hospitals in Japan. **MedRxiv**, 2020.

SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.

SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, n. June 2019, p. 120338, 2020.

SINGH, G. et al. Novel aptamer-linked nanoconjugate approach for detection of waterborne bacterial pathogens: an update. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 1, 2017.

SINGH, M.; KAUR, N.; COMINI, E. Role of Self-Assembled Monolayers in Electronic Devices. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, n. 12, p. 3938–3955, 2020.

SKLÁDAL, P. Electrochemical detection for biological identification. **Biological Identification**, p. 131–152, 2014.

SLAUGHTER, G. Current Advances in Biosensor Design and Fabrication. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p. 1–25, 2018.

SNAK, C.; AYMARD C, G. A.; DE QUEIROZ, L. P. A new species of Canavalia (Leguminosae, Papilionoideae) subgenus Wenderothia from the Colombian and Venezuelan Llanos. **Brittonia**, v. 70, n. 2, p. 233–240, 2018.

SPINELLI, A.; PELLINO, G. COVID-19 pandemic: perspectives on an unfolding crisis. **British Journal of Surgery**, v. 107, n. 7, p. 785–787, 2020.

STEFFENS, C. et al. Atomic Force Microscopy as a tool applied to nano/biosensors. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 6, p. 8278–8300, 2012.

STERN, O. Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht. **Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie**, v. 30, n. 21–22, p. 508–516, 1924.

STEVENSON, H. et al. The Anatomy of a Nonfaradaic Electrochemical Biosensor. **SLAS Technology**, v. 23, n. 1, p. 5–15, 2018.

STILLMARK, P. H. **Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einige anderen Euphorbiaceen. Inaugural dissertation Dorpat, Tartu.** [s.l.: s.n.].

STRANDBERG, E. et al. Influence of C-terminal amidation on the antimicrobial and hemolytic activities of cationic α -helical peptides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 717–728, 2007.

STRONG, M. E. et al. Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 177, n. May 2020, p. 112949, 2021.

SUCHOMEL, P. et al. Simple size-controlled synthesis of Au nanoparticles and their size-dependent catalytic activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 1023–1052, 2016.

SUN, S. et al. Analytic formulas of peak current in cyclic voltammogram: Machine learning as an alternative way? **Journal of Chemometrics**, n. October 2020, p. 1–8, 2020.

SUN, Y.; MAYERS, B.; XIA, Y. Metal Nanostructures with Hollow Interiors. **Advanced Materials**, v. 15, n. 78, p. 641–646, 2003.

SURKOVA, E.; NIKOLAYEVSKYY, V.; DROBNIEWSKI, F. False-positive COVID-19 results: hidden problems and costs. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1167–1168, 2020.

SUVARNA, G.; SHARMA, B. B. Concanavalin -a potential glycoprotein. **Journal of proteins and proteomics**, v. 9, n. 2, p. 77–90, 2018.

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.

TAZWAR, T. M. Nano thermoelectric generator for wireless biomedical sensors. **1st International Conference on Robotics, Electrical and Signal Processing Techniques, ICREST 2019**, p. 490–492, 2019.

THAMILSELVAN, A. et al. Improved electrocatalytic activity of Au@Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for sensitive dopamine detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 1–8, 2019.

THEVENOT, D. et al. Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification. 2014.

TRASTOY, R. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Fighting Antimicrobial Resistance**, v. 33, n. 3, p. 1–18, 2020.

TULLUS, K. Defining urinary tract infection by bacterial colony counts: a case for 100,000 colonies/ml as the best threshold. **Pediatric Nephrology**, v. 34, n. 10, p. 1651–1653, 2019.

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.

UDUGAMA, B. et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS nano**, 2020.

VAISOCHEROVÁ, H. et al. Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 20, p. 7894–7901, 2008.

VÁSQUEZ, G. et al. Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 453–458, 2017.

VITORINO, L. C.; BESSA, L. A. Technological microbiology: Development and applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–23, 2017.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 3. ed. [s.l.] JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION, 2006.

WANG, K. et al. Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2365–2373, 2015.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4367, p. 825–826, 1952.

WONSAWAT, W. et al. A paper-based conductive immunosensor for the determination of Salmonella Typhimurium. **Analyst**, v. 145, n. 13, p. 4637–4645, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum**. Geneva: [s.n.].

WU, Y. et al. A novel approach based on magneto-electric torque sensor for non-contact biomarkers detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 276, n. March, p. 540–544, 2018.

XU, X. et al. Exploiting pH-Regulated Dimer-Tetramer Transformation of Concanavalin A to Develop Colorimetric Biosensing of Bacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

XUE, Y. et al. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014.

YAGHOUBI, M. et al. A lectin-coupled porous silicon-based biosensor: label-free optical detection of bacteria in a real-time mode. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

ZDRACHEK, E.; BAKKER, E. Potentiometric Sensing. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 2–26, 2019.

ZELADA-GUILLÉN, G. A. et al. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 22, p. 9254–9260, 2010.

ZHANG, G. et al. Lateral force calibration for atomic force microscope cantilevers using a suspended nanowire. **Nanotechnology**, v. 31, n. 47, 2020.

ZHENG, L. et al. Lectin functionalized ZnO nanoarrays as a 3D nano-biointerface for bacterial detection. **Talanta**, v. 167, n. December 2016, p. 600–606, 2017.

ZHOU, B.; YANG, J.; LI, Q. Smartphone-based activity recognition for indoor localization using a convolutional neural network. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 3, p. 1–15, 2019.

ZHOU, H. et al. Ultrasensitive DNA monitoring by Au-Fe 3O 4 nanocomplex. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 163, n. 1, p. 224–232, 2012.

ZHOU, J. et al. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 142, n. April, p. 111449, 2019.

ZHOU, W. et al. Gold Nanoparticles for in Vitro Diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10575–10636, 2015.

APÊNDICE A – PATENTE 1

“DISPOSITIVO NANOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO ATRAVÉS DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO”

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 012453 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Nome ou Razão Social: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO CATÓLICA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00331801000130

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: QS 01, Rua 210, Lote 40, Salas 1105 e 1106, Águas Claras

Cidade: Taguatinga

Estado: DF

CEP: 71950-770

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 03226149001587

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Avenida Tamandaré, nº 6000, Jardim Seminário

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79117-900

País: BRASIL

Telefone: (67) 331 23300

Fax: (67) 331 23301

Email:

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): DISPOSITIVO NANOSENSOR PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO ATRAVÉS DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO

Resumo: A presente invenção é resultado de uma metodologia simples e rápida para a obtenção de um dispositivo direcionado para a detecção sensível de patógenos presentes em amostras líquidas. O método de montagem da plataforma nanoestruturada compreende a formação de monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) sobre o ouro do eletrodo, seguida de nanopartículas Fe₃O₄@Au funcionalizadas com L-cisteína e do peptídeo antimicrobiano de origem marinha clavanina A (ClavA). Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, cuja natureza eletronegativa é diferenciada de acordo com a composição de suas paredes e membranas celulares, foram os analitos-alvo. Um método de avaliação da montagem da plataforma biossensora é descrito. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada como método para avaliar a detecção dos microrganismos, o qual acarreta na mudança da impedância, sendo específica para cada espécie de microrganismo em determinada concentração de unidades formadoras de colônia. O processo de montagem da plataforma nanossensora MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA dura em média 15 minutos, apresentando os resultados e diagnóstico entre 1-5 minutos. Ademais, o sistema sensor desenvolvido apresenta um limite de detecção de 10¹ a 10⁶ UFC.mL⁻¹.

Figura a publicar: 2

Inventor 1 de 8

Nome: ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

CPF: 09575433440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua A 17, nº 48, Rio Doce

Cidade: Olinda

Estado: PE

CEP: 53150-230

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 484632

Fax:

Email: albertogaldino16@gmail.com

Inventor 2 de 8

Nome: ISAAC AARÓN MORALES FRIAS

CPF: 01821530454

Nacionalidade: Mexicana

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua José Nunes da Cunha, nº 378, Piedade

Cidade: Jaboatão dos Guararapes

Estado: PE

CEP: 54410-280

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 340834

Fax:

Email: iam.ibt@gmail.com

Inventor 3 de 8

CPF: 00966001443

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Estrada das Ubaias, nº 713, apto. 302, Casa Forte

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52061-080

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 477541

Fax:

Email: m_danielly@yahoo.com.br

Inventor 4 de 8

Nome: REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

CPF: 03547189403

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Amália Bernadino de Souza, nº 670, apto. 1601, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51021-150

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 749644

Fax:

Email: goncalves_reginaldo@hotmail.com

Inventor 5 de 8

Nome: SANDRA REGINA DE SÁ

139

CPF: 08178824485

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Cento e oito, nº 375, Jardim Paulista

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 53407-270

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 465133

Fax:

Email: gi_212@hotmail.com

Inventor 6 de 8

Nome: OCTÁVIO LUIZ FRANCO

CPF: 75523400378

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Tokio, nº 652, Vila Palmira

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79112-180

País: BRASIL

Telefone: (67) 999 854942

Fax:

Email: ocfranco@gmail.com

Inventor 7 de 8

Nome: OSMAR NASCIMENTO SILVA

140

CPF: 02449877509

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Empresário e produtor de espetáculos

Endereço: Rua Babaçu, 03, Res. Art Life Design, 2109, Águas Claras Sul

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 71928-000

País: BRASIL

Telefone: (61) 999 382768

Fax:

Email: osmar.silva@catolica.edu.br

Inventor 8 de 8

Nome: CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE

CPF: 02431455432

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Estrada das Ubaías, nº 713, apto. 302, Casa Forte

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52061-080

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 140044

Fax:

Email: csrandrade@gmail.com

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU e comp - COA 267.pdf
Procuração	Procuração UCB-UBEC - COA 267.pdf
Ata da Assembléia Geral Eletiv	Ata 125 - 2019 a 2021 - Representação Legal da UCB-UBEC - COA 267.PDF
Procuração	Procuração UCDB - COA 267.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo - COA 267.pdf
Reivindicação	Reivindicações - COA 267.pdf
Desenho	Figuras - COA 267.pdf
Resumo	Resumo - COA 267.pdf

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A891BE7

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 14/03/2019

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

Bactéria

Bacillus subtilis

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA

UF: PE

Município: Recife

Bactéria

Staphylococcus aureus

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA

UF: PE

Município: Recife

Bactéria

Escherichia coli

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA

UF: PE

Município: Recife

Bactéria

Klebsiella pneumoniae

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA

UF: PE

Município: Recife

Bactéria

Pseudomonas aeruginosa

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA

UF: PE

Município: Recife

Bactéria

Acinetobacter baumannii

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA

UF: PE

Município: Recife

Bactéria

Staphylococcus aureus

Estirpe/Linhagem/Cepa: ATCC 25923

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA

UF: PE
Município: Recife

Bactéria
Escherichia coli
Estirpe/Linhagem/Cepa: ATCC 25922
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: UFPEDA
UF: PE
Município: Recife

Declaração de veracidade

☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

DISPOSITIVO NANOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO ATRAVÉS DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO

Campo Técnico

01. A presente invenção dispõe de aplicabilidade na área de biossensores, mais precisamente no diagnóstico clínico e laboratorial de microrganismos causadores de infecções em humanos e animais. Refere-se a identificação desses agentes infectantes por meio da técnica eletroquímica. A invenção consiste na imobilização de um peptídeo antimicrobiano (PAM) obtido a partir dos hemócitos do tunicado marinho *Styela clava* à superfície de nanopartículas metálicas depositadas à superfície de um substrato metálico para a detecção de patógenos em baixas concentrações. Particularmente, na invenção proposta foi desenvolvido uma plataforma biossensora nanoestruturada para a identificação rápida e sensível de microrganismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

02. A nanotecnologia e seus materiais, associados a área da biologia e saúde têm se mostrado ferramentas promissoras quando aplicados ao tratamento e diagnóstico na medicina moderna, apresentando-se como uma área em constante crescimento. Nanopartículas metálicas como as de ferro (AgNPs), ouro (AuNPs) e magnetita (Fe_3O_4) exibem propriedades físico-químicas únicas e extremamente úteis para a mais diversa gama de utilidades. *Drug-delivery* e liberação controlada de medicamentos, terapia fotodinâmica e fototermal, uso como coadjuvantes na tomografia computadorizada e imagem celular, bem como o emprego em biossensores eletroquímicos são alguns exemplos mais clássicos de

aplicações dessas nanopartículas. Nanopartículas magnéticas como a Fe_3O_4 apresentam características, tamanho e estrutura relevantes e com elevado potencial em aplicabilidades na área de biossensores. Sua síntese simples, elevada razão superfície-volume e possibilidade de modificação química e biológica da superfície permitem a sua funcionalização, e conseqüentemente, maior aplicabilidade e desenvolvimento de novos materiais (MOUT et al., 2012).

03. A invenção proposta envolve a construção de uma plataforma biossensora nanoestruturada para a detecção de microrganismos patogênicos, fazendo uso da técnica eletroquímica para avaliar a construção do nanossensor, bem como para o diagnóstico de patógenos com elevada sensibilidade e especificidade. Evidenciamos, portanto, uma inovadora metodologia de plataforma sensora a ser construída em superfícies de ouro, como de eletrodos e/ou chips miniaturizados.

Estado da Técnica

04. Infecções nosocomiais (IN), popularmente conhecidas como infecções hospitalares permanecem sendo um problema de saúde pública atual e crescente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta dados relevantes em relação ao impacto da IN no mundo. Cerca de 4 milhões de pessoas são acometidas por IN anualmente na Europa, chegando a 1,7 milhões apenas nos EUA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). No Brasil, a IN constitui-se como a quarta maior causa de mortalidade, o qual de 5-15% dos pacientes hospitalizados e 25-35% de pacientes presentes na UTI

adquirem IH (MACIEL; CÂNDIDO, 2010). Cerca de 75% da carga de IN são presentes em países em desenvolvimento, apontando, portanto, uma primordialidade na atenção sobre essas populações (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015).

05. Ademais, a água apresenta-se como material indispensável para a vida. A contaminação de água por patógenos também permanece sendo um problema de saúde pública, principalmente na África e outros países em desenvolvimento, infectando milhões de pessoas, além de animais domésticos e animais do gado utilizados como alimento (FENWICK, 2006; PRAVEEN et al., 2016). Doenças transmitidas pela água (diarreia, doenças gastrointestinais, cólera, etc.) causadas por bactérias, vírus, helmintos e protozoários têm sido a causa de surtos alarmantes. De acordo com a OMS, cerca de 3,4 milhões de pessoas, em sua maioria crianças, morrem por doenças relacionadas a água contaminada por microrganismos (PANDEY et al., 2014).

06. Os métodos de diagnóstico presuntivo para detecção de microrganismos são variados. As metodologias mais comumente utilizadas envolvem o ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ELISA), baseando-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis por reações enzimáticas (VERMA; SAXENA; BABU, 2013); meios de cultura seletivos na forma sólida, semissólida e caldos, além de testes enzimáticos por indicadores químicos (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015). A nível molecular, a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), destaca-se entre as demais (GADSBY et al., 2015).

07. Entretanto, tais métodos supracitados frequentemente exibem resultados falso-positivos (TERATO et al., 2014). Testes

moleculares dispõem de problemas notáveis como alto custo de equipamentos e reagentes, mão-de-obra especializada e pré-tratamento de amostras (LÓPEZ et al., 2009). Outro inconveniente é ostentado por testes em meios de cultura, havendo a necessidade de espera do crescimento do microrganismo após semear em um meio específico, necessitando de 2 a 3 dias para resultados iniciais, além de 7 a 10 dias para confirmar qual microrganismo afeta o paciente (VELUSAMY et al., 2010). Percebe-se, portanto, a necessidade urgente de abordagens inovadoras no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico presuntivo de microrganismos patogênicos que possua atributos como rapidez, sensibilidade, facilidade de uso e baixo custo para promoção da saúde e aumento na qualidade de vida.

08. A aplicação de biossensores com abordagem na detecção de analitos de interesse clínico é um mercado em crescimento contínuo. Da última década até a atual, o mercado mundial de sensores apresentou dados promissores, o qual um estudo aponta seu crescimento de € 119,4 bilhões em 2006 para € 184,1 bilhões em 2016 (SCOGNAMIGLIO et al., 2016). Tais dispositivos são constituídos basicamente por um elemento sensor biológico ativo (como peptídeos, anticorpos, enzimas, fragmentos de DNA, etc.) cujo atributo essencial é o de especificidade ao analito; e um transdutor físico-químico responsável por converter a detecção bioquímica em um sinal elétrico detectável (AHN et al., 2011; GRIESHABER et al., 2008; LUZ; IOST; CRESPILO, 2013).

09. Transdutores eletroquímicos permanecem sendo um dos principais utilizados na construção de biossensores, haja vista sua excelente condutividade, estabilidade, baixo custo, além de

possibilidade de uso em dispositivos miniaturizados portáteis. Técnicas eletroquímicas como a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) reunidas com plataformas biossensoras nanoestruturadas em eletrodos têm se revelado ferramentas relevantes para o estudo de superfícies e interfaces, empregando-as na avaliação da detecção de analitos de interesse clínico, como microrganismos causadores de doenças (ANDRADE et al., 2015; OSIPOVICH et al., 2016).

10. Diante do problema da resistência a antimicrobianos, os peptídeos antimicrobianos (PAM) surgiram como alternativa inovadora ao implementá-los como novos agentes antibióticos contra microrganismos resistentes a medicamentos convencionais. Sua notável seletividade e interação a células microbianas permitiu que sua aplicabilidade rompesse seu principal atributo de atividade antimicrobiana, para poder ser explorado no desenvolvimento de biossensores (LI et al., 2014; PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010).

11. Visando a elaboração de metodologias efetivas na detecção de microrganismos promovendo a prevenção de doenças graves, alguns estudos foram realizados. A patente WO2018102350 se refere a construção de um sensor bacteriano constituído de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com bacteriófagos. Tal sensor compreende inicialmente o recobrimento de eletrodo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e outro tipo de bacteriófagos, seguido da inserção das nanopartículas modificadas na amostra em eppendorf para ligação ao analito e por fim aplica-se o eletrodo para conjugação final. Foram avaliadas a detecção de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

12. Além do supracitado, a patente US20120156688A1 relata o uso do peptídeo antimicrobiano magainina 1 modificado com um resíduo de cisteína imobilizado em um arranjo de eletrodo interdigitado para detecção de microrganismos como *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *E. coli* ATCC 35218, e *L. monocytogenes*. A patente US20050059105A1 também envolveu o uso de eletrodos interdigitados o qual teve sua superfície recoberta por anticorpos específicos para determinados microrganismos. Já a patente CN204203160U descreve o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para detecção de *E. coli* com uma estrutura composta por nanotubos de carbono com azul da Prússia, uma camada de compósito de nanopartículas de ouro e o anticorpo HRP para se ligar ao analito em questão, em método sanduíche. Havendo a ligação do microrganismo e do anticorpo, uma resposta eletroquímica é apresentada.

13. Ademais, pode-se citar as patentes WO2014159904A1 e US20070231833A1, que propõem métodos de detecção de microrganismos utilizando um peptídeo antimicrobiano modificado por porfirinas e o peptídeo antimicrobiano modificado por anticorpos, respectivamente, ambos utilizando espectroscopia de fluorescência para detectar o evento de interação entre elemento sensor e analito.

14. Verifica-se, portanto, que a presente invenção se diferencia das anteriormente citadas pelo fato de ser a única que combina monocamadas automontadas de organosulfurados, nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ em estrutura core-shell (núcleo-casca) e peptídeo antimicrobiano marinho Clavanina A (ClavA) para detecção e diferenciação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por meio da técnica eletroquímica.

15. Algumas características podem ser apontadas como semelhantes quando as patentes previamente citadas se comparam com a invenção proposta. Entretanto, diferenças cruciais podem ser observadas entre os exemplos utilizados, como pode ser visualizado na Tabela 1.

16. Tabela 1 – Tabela comparativa entre características dos componentes das patentes citadas e da invenção proposta:

	<i>Monocamadas Automontadas de Organosulfurados</i>	<i>Nanopartículas metálicas</i>	<i>Peptídeo Antimicrobiano</i>	<i>Anticorpos</i>
Invenção Proposta	Sim	Sim (Fe ₃ O ₄ @Au)	Sim (Clavanina A)	Não
WO2018102350	Não	Sim (Fe ₂ O ₃)	Não	Não
US20120156688A1	Não	Não	Sim (Magainina 1)	Não
US20050059105A1	Não	Não	Não	Sim
CN204203160U	Não	Sim (AuNPs)	Não	Sim
WO2014159904A1	Não	Não	Sim (Indolicidina, Cecropina- Melitina, Bactenecina, Polimixina E)	Não
US20070231833A1	Não	Não	Sim (Cy5CP1_c, Cy5PGQ_c, Cy5CTA_c, Cy5CA_c, Cy5CPF-3_c, Cy5ser5P1_c, Cy5SMAP_c, Cy5PL_c)	Sim

Problemas do estado da técnica

17. Os métodos tradicionais de diagnóstico presuntivo de microrganismos (ELISA, meios de cultura seletivos na forma sólida, semissólida e caldos, além de testes enzimáticos por indicadores químicos e PCR) frequentemente exibem resultados falso-positivos. Testes moleculares exibem alto custo de equipamentos e reagentes, mão-de-obra especializada e necessidade de pré-tratamento de amostras. Em meios de cultura há necessidade de espera do crescimento do microrganismo após semear em um meio específico, aproximadamente 2 a 3 dias para resultados iniciais, além de 7 a 10 dias para confirmar qual microrganismo afeta o paciente.

Objetivo da invenção

18. A presente invenção tem como objetivo apresentar um novo dispositivo biossensor nanoestruturado com monocamadas automontadas do ácido 4-mercaptobenzóico e nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ no formato core-shell associadas ao peptídeo antimicrobiano marinho clavanina A.

19. A invenção aqui proposta objetiva a aplicação do biossensor desenvolvido para detecção de microrganismos de interesse clínico em pequenas quantidades de amostras líquidas (4 μL), de maneira rápida (3 minutos) e sensível, possuindo um limite de detecção de 10^1 a 10^6 UFC.mL⁻¹.

20. Ademais, a invenção em questão determina a possibilidade de miniaturização e portabilidade do dispositivo, devido a sua associação à técnica eletroquímica de análise, destacando

também a não necessidade de utilização de marcadores uma vez que a técnica aponta alterações nas propriedades elétricas de superfície (como capacitância e resistência à transferência de carga), culminando em uma resposta específica (o aumento da impedância da corrente) o qual definirá a presença de um microrganismo em determinada concentração de unidades formadoras de colônia (UFC).

Solução do Problema

21. A invenção proposta dispõe, como ato inventivo, destacado na reivindicação 1, a obtenção de um sistema biossensor nanoestruturado composto por monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico, nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ em formato core-shell e peptídeo antimicrobiano Clavanina A para um diagnóstico rápido e sensível de microrganismos como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico. Tal ato destaca o biodispositivo sensor apresentado como inovador com diversas vantagens em comparação com os métodos tradicionais de detecção de microrganismos patogênicos, mostrando-se como uma abordagem inovadora e econômica, tanto relacionado ao tempo de obtenção de resultados, quanto de custo.

Vantagens

22. A invenção proposta apresenta uma plataforma biossensora de composição única e inovadora, cuja elevada

sensibilidade se dá pelos componentes estruturais da mesma. Tal plataforma fornece um ambiente ideal para a interação de microrganismos em amostras líquidas, o qual seu elemento sensor, o peptídeo antimicrobiano marinho Clavanina A é altamente seletivo à disposição de células microbianas.

23. A modificação de superfície de determinados eletrodos com superfície de ouro para biossensores eletroquímicos exibe a habilidade de detecção específica de um certo analito presente em uma amostra. Tal ação influencia diretamente as propriedades físico-químicas da superfície do biossensor em questão, habilitando-o para ocorrerem interações específicas e bloqueando ligações não-específicas.

24. Diversos benefícios são obtidos relacionados ao uso de monocamadas automontadas (MAM): longa duração de fixação nas mais variadas superfícies, estabilidade, controle molecular, além da simples e rápida síntese, tornou tal abordagem uma ferramenta valiosa na aplicação e modificação de superfícies como as de um eletrodo de trabalho usado na confecção de uma plataforma biossensora nanoestruturada. A estrutura da biomolécula a ser utilizada para a construção da MAM estabelecerá a espessura da monocamada, além de sua orientação e organização em determinada superfície. A biomolécula de escolha, o ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) forma uma monocamada automontada em toda superfície do ouro do eletrodo de trabalho devido ao grupo tiol (-SH) presente em sua estrutura. Organosulfurados como o MBA, portanto, se ligarão ao ouro por quimissorção espontânea, resultando na perda do hidrogênio do grupo tiol como hidrogênio molecular (H_2). Tal ato culminará em uma ligação S-Au (enxofre-

ouro) forte, covalente e favorecida termodinamicamente. Ademais, o anel aromático presente na estrutura do AMB desencadeia uma transferência de elétrons mais eficiente e estável que ocorrerá entre a solução eletrolítica adjacente composta pelo par redox $K_4 [Fe(CN)_6]^{4-}/K_3 [Fe(CN)_6]^{3-}$, resultando, portanto, em uma resposta eletroquímica mais estável.

25. Nanopartículas metálicas, sobretudo as magnéticas como a Fe_3O_4 têm sido reportadas como substratos promissores na imobilização de moléculas. Sua conformação nanoestruturada e características físico-químicas únicas são de grande interesse na área biomédica. Tal veículo apresenta uma superfície com nanoambiente favorável para recobrimento com biomoléculas, além de ser um excelente condutor de transferência de elétrons entre o eletrodo e solução eletrolítica e, portanto, qualifica-se como elemento promissor para aplicações em biossensores. Ademais, a modificação da superfície dessas nanopartículas com o ouro, formando uma estrutura do tipo core-shell (resultando na nanopartícula $Fe_3O_4@Au$) as aplicabilidades dessa nova nanopartícula crescem consideravelmente, aumentando as possibilidades de ligação de diferentes grupos químicos como carboxila e amina, presente nas mais variadas estruturas biológicas. $Fe_3O_4@Au$ dispõem de excelente estabilidade, além de elevada razão superfície-volume e biocompatibilidade na presença do ouro, resultando em elevada sensibilidade em dispositivos biossensores.

26. Inicialmente utilizados como solução inovadora no combate a resistência a antimicrobianos, os peptídeos antimicrobianos apresentam, em sua maioria, uma estrutura α -hélice anfipática catiônica que se dobram em uma estrutura anfipática

quando há contato com uma barreira lipídica de uma célula alvo. Dentre eles, a Clavanina A (ClavA) se destaca como um peptídeo antimicrobiano de estrutura rica de resíduos de glicina, histidina e fenilalanina (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-NH₂). ClavA apresenta uma superfície positivamente carregada que interage de maneira distinta com as diferentes camadas fosfolipídicas presente em microrganismos. Bactérias Gram-positivas exibem uma camada espessa de peptidoglicano, que resulta em uma camada superficial mais positiva em relação às bactérias Gram-negativas, que ostentam uma camada fina e interna de peptidoglicano, expressando uma superfície carregada eletronegativamente. Tal característica de diferença de carga superficial dos microrganismos permite sua diferenciação tanto a nível de espécie quanto a nível de concentração a partir da resposta eletroquímica obtida pela sua interação com o sistema proposto com o elemento sensor ClavA.

27. O sistema sensor nanoestruturado da invenção determina respostas sensíveis frente às diferentes concentrações das diferentes espécies de microrganismos, como as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com um limite de detecção que varia de 10¹ a 10⁶ UFC.mL, além de ostentar fácil preparo e manuseio, permitindo seu uso em laboratórios clínicos e centros de pesquisa.

Descrição da Invenção

28. Antes da construção do biossensor, houve a síntese das nanopartículas de Fe₃O₄@Au modificadas por cisteína, um coadjuvante essencial na invenção proposta.

29. Inicialmente, as Fe_3O_4 foram sintetizadas através do método de co-precipitação do cloreto férrico ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e cloreto ferroso ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Resumidamente, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2 M) são adicionados a uma solução de NaOH (concentração entre 10-25 M) em 60 mL de água sob agitação magnética entre 50-60 °C. Seguiu-se então com a adição de 10 mL de NaBH_4 (concentração entre 1-6 M), gota a gota, à solução previamente preparada, mantendo-a ainda em agitação constante entre 1-3 horas. Nota-se a obtenção de uma solução enegrecida. Posteriormente, as nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas são separadas por campo magnético e lavadas três vezes com água deionizada ultrapura.

30. Para a obtenção das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ core-shell, as Fe_3O_4 previamente sintetizadas passam pelo seguinte processo de redução gradual do cloreto de ouro (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) por NaBH_4 na solução de Fe_3O_4 : sumariamente, 300 mL de água deionizada e $\text{HAuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (concentração entre 1-5 μM) é adicionada em um balão de fundo redondo de 500 mL. Consecutivamente, as nanopartículas Fe_3O_4 preparadas são adicionadas à solução anterior, sendo mantida sob agitação vigorosa entre 80-90 °C. Segue-se então a adição de NaBH_4 (concentração entre 0.1-0.6 mM) gota a gota à solução presente no balão em agitação. É visualizado uma mudança gradual da cor da solução, que muda de enegrecido para amarronzado. A reação é mantida em agitação e aquecida entre 1-3 horas, e por fim, resfriada em temperatura ambiente. Finaliza-se então com a decantação sob campo magnético das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ núcleo-casca (*core-shell*) sintetizadas, sendo em seguida lavadas três vezes com água deionizada ultrapura e seco em estufa.

31. A obtenção da nanopartícula modificada por cisteína ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-Cys}$) a ser utilizada na plataforma biossensora nanoestruturada da presente invenção é obtida por: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ previamente sintetizadas são colocadas em um balão de fundo redondo de 100 mL com 25 mL de L-cisteína (concentração entre 1-10 M), sendo mantida sob agitação constante overnight. As nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-Cys}$ obtidas passam por banho ultrassônico entre 1-3 horas, são lavadas três vezes com água deionizada ultrapura sob campo magnético para remover a cisteína não ligada às nanopartículas, para posteriormente serem ressuspensas em água ultrapura e estocada a $5^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

32. O peptídeo antimicrobiano ClavA ($\text{VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHF-NH}_2$) é diluído entre 50-150mM em uma solução composta de água ultrapura/etanol absoluto (60/40).

33. A construção do biossensor proposto segue o seguinte processo:

34. Um eletrodo de trabalho com superfície de ouro ($\phi = 2$ mm) foi utilizado para construção da plataforma nanossensora. O eletrodo de trabalho foi suavemente polido com lixa, seguida de imersão em HClO durante 2 minutos, tendo por fim sua superfície lavada com água deionizada ultrapura. Após o processo de limpeza de superfície de ouro do eletrodo, o mesmo passou por varredura por voltametria cíclica (VC) entre -0.2 e 0.7 V em 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ com tampão fosfato (pH 7.4) até um voltamograma característico de eletrodo de ouro limpo ser obtido. Posteriormente, o eletrodo teve sua superfície modificada pela solução de ácido 4-mercaptobenzóico (concentração entre 1-15mM) em etanol absoluto.

O eletrodo é seco a temperatura ambiente, para obtenção de monocamadas automontadas de MBA na superfície de ouro do eletrodo. Em seguida, os grupos carboxílicos livres presentes na estrutura do MBA foram ativados utilizando uma solução dos agentes acopladores N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (0.4 M EDC - 0.1 M NHS, 1:1, v/v) durante o tempo de 3 minutos. Subsequentemente, as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-Cys}$ dispersas em água ultrapura foram aplicadas à superfície das monocamadas automontadas de MBA presente no eletrodo de trabalho. Seguiu-se então com uma segunda imersão no EDC:NHS para a ativação dos grupos amina presentes na estrutura da cisteína ligada à superfície das $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$. Finalmente, entre 50-150 μM do peptídeo antimicrobiano ClavA foi adsorvido no eletrodo de ouro modificado, resultando na obtenção do sistema biossensor MBA_ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-Cys}$ _ClavA.

35. Foram avaliadas diferentes espécies de bactérias, dentre elas, as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); e as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As mesmas foram semeadas em ágar Mueller-Hinton durante 24 horas a 37 °C. Seguida ao seu crescimento, cada bactéria foi colhida e disposta em solução salina esterilizada (0,9%). Posteriormente, as bactérias foram separadas em diferentes concentrações de unidades formadoras de colônia (UFC), mais precisamente 10^1 a 10^6 UFC.mL⁻¹. Tal processo foi realizado através da espectroscopia UV-Vis com densidade óptica em 60nm e ajustado para 0.50. 4 μL da suspensão bacteriana em determinada concentração (10^1 a 10^6 UFC.mL⁻¹) foi adsorvida na superfície da

plataforma biossensora nanoestruturada, para posterior análise dos espectros de impedância obtidos a partir dos diagramas de Nyquist.

36. A caracterização de montagem da plataforma biossensora, bem como caracterização do evento de interação da mesma com os analitos alvo, foi realizada por meio da técnica eletroquímica. As análises voltamétricas (utilizadas apenas na avaliação de montagem do biossensor) e as análises impedimétricas foram executadas por meio de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N (Ecochemie, Netherlands), tendo como interface computacional o software NOVA 1.8. Os ensaios de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram efetuadas em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos, o qual foram imersos em uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10mM) em 20 mL de tampão fosfato (pH 7.4), tendo o papel de sonda redox. O eletrodo de trabalho (ET) com superfície de ouro ($\phi = 2 \text{ mm}$) foi o instrumento o qual a plataforma biossensora nanoestruturada composta por monocamadas automontadas de MBA, nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-Cys}$ core-shell e peptídeo antimicrobiano ClavA foi construída. Eletrodo de fio de platina foi implementado como contra-eletrodo (CE). Ag/AgCl (com KCl 3M) foi utilizado como eletrodo de referência (ER). As medidas voltamétricas foram realizadas em potencial de -0,2 a 0,7 com uma taxa de varredura de 50 mV.s^{-1} . Ademais, análises impedimétricas foram executadas na frequência de 100 mHz a 100 kHz com amplitude e onda senoidal variando entre 1-15 mV. Todas as medidas eletroquímicas foram conduzidas dentro de uma gaiola de Faraday.

Listagem e Descrição de Figuras

37. A invenção proposta será descrita mais detalhadamente por meio de figuras.

38. Na figura 1 temos uma representação da configuração de um sistema de 3 eletrodos utilizado para a obtenção dos resultados eletroquímicos da presente invenção. Tal sistema encontra-se no lado interno de uma gaiola de Faraday. Os três eletrodos utilizados foram o eletrodo de trabalho (1), local onde foi realizada a montagem da plataforma biossensora nanoestruturada, deixando-o apto para o processo de interação com o analito de interesse; o eletrodo de referência (2) foi utilizado para a obtenção de um potencial estável e reproduzível, cujo potencial de (1) será medido contra ele; e o contra-eletrodo (3) forneceu uma corrente através da célula eletroquímica (4), composta de um material inerte, local este onde será inserida a solução eletrolítica (5) de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ agindo como um par redox. 1, 2 e 3 são conectados em cabos ligados a um potenciostato/galvanostato (6), local onde os dados eletroquímicos obtidos serão processados para posteriormente serem analisados por um sistema de obtenção de dados (7) interfaceado a um software específico para estudos eletroquímicos, como os que ocorrem na elaboração de biossensores.

39. Na figura 2 observa-se uma representação esquemática do processo de montagem da plataforma biossensora proposta.

40. A figura 2 (a) representa a formação da monocamada automontada de MBA (8) sobre a superfície de ouro (9) do eletrodo (1), formação essa favorecida pelo grupo tiol presente na estrutura de (8) levando a uma forte ligação Au-S, formando uma composição eletroquimicamente estável em (9) para promoção da transferência de elétrons entre a solução (5) com o eletrodo (1).

41. Na figura 2 (b) encontra-se a interação das nanopartículas core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-Cys}$ (10) com a monocamada de (8), favorecida pela presença do aminoácido cisteína (11) inserida à superfície de ouro da estrutura das nanopartículas (10). A interação de (11) com (8) e deu pela ligação do grupo carboxílico de (8) livre com o grupo amina presente na estrutura da (11).

42. Na figura 2 (c) temos a representação da interação do peptídeo antimicrobiano marinho ClavA (12) com o os demais componentes da plataforma nanossensora. Sua ligação ao aminoácido (11) conectado à estrutura da nanopartícula (10) se dá pela interação de grupamentos amina presentes na estrutura do peptídeo (12) com os grupos carboxílicos livres de (11). O peptídeo (12) muda de conformação estrutural ao entrar em contato com as membranas das células bacterianas alvo (13), partindo de uma orientação sem estrutura definida para uma conformação α -hélice anfipática, que facilita sua inserção às membranas de (13). Tal processo de inserção peptídeo-membrana, associado às interações entre a cationicidade presente na estrutura do peptídeo (12) com as diferentes cargas presentes na superfície das células alvo (13), conduzirá a uma resposta eletroquímica específica e definida interespecies. A presença do analito alvo (13) influencia o campo elétrico, bem como a dupla camada elétrica formada na interface entre a plataforma biossensora da invenção proposta com a solução eletrolítica adjacente, induzindo a uma mudança na impedância do sistema.

43. Na figura 3 temos a estrutura tridimensional do peptídeo antimicrobiano marinho ClavA (12), de estrutura rica em resíduos de glicina, histidina, fenilalanina (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHF-

NH₂), componente essencial da invenção proposta, o qual conduzirá o processo de interação com as diferentes espécies de microrganismos alvo (13). A estrutura foi obtida na Protein Data Bank, com o PDB ID de número **6C41**.

44. A figura 4 descreve a análise por voltametria cíclica (VC) referente ao processo de montagem da plataforma biossensora nanoestruturada proposta. Observa-se um voltamograma cíclico reversível com picos catódicos e anódicos bem definidos. Inicialmente, em preto temos uma curva característica (14) para o eletrodo de trabalho (1) com superfície de ouro (9) limpo. Em vermelho (15) obteve-se uma diminuição nas correntes de pico após a aplicação do MBA, resultando na formação da monocamada (8). Em seguida, a ligação das nanopartículas (10) é confirmada após sua aplicação à (8) pela obtenção do voltamograma em cor azul, com fechamento de picos mais acentuado (16). Finaliza-se, portanto, a avaliação da plataforma proposta através da voltametria cíclica com o voltamograma em verde (17), o qual se refere à ligação do peptídeo (12) com as nanopartículas (10).

45. Na figura 5 temos os resultados da montagem da plataforma biossensora nanoestruturada através da análise por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), baseado, principalmente, na medida da resistência a transferência de carga (R_{ct}) que ocorre na interface entre eletrodo (1) com superfície de ouro (9) e a solução eletrolítica (5). É importante destacar que a inserção de uma camada bloqueadora na superfície de (9), resulta na mudança do R_{ct} , levando, portanto, a alterações no tamanho e intensidade do semicírculo de Cole-Cole característico da análise por EIE. Em preto (18) temos o espectro relativo ao eletrodo limpo,

exibindo um $R_{ct} = 83,9 \, \Omega$. Em contrapartida, o $R_{ct} = 389 \, \Omega$ obtido pela monocamada de (8) demonstrada pelo espectro em vermelho (19) é maior que de seu antecessor, confirmando a formação da monocamada automontada. Em seguida observa-se o espectro em azul (20) referente a inserção das nanopartículas (10) ao sistema sensor, expondo uma resposta impedimétrica maior, com $R_{ct} = 581 \, \Omega$. Finaliza-se a análise da plataforma biossensora por EIE com o espectro em verde (21) relacionado à ligação do peptídeo antimicrobiano (12) com as nanopartículas (10), apresentando a maior resposta impedimétrica do sistema, com $R_{ct} = 840 \, \Omega$.

46. As análises por VC e EIE forneceram, portanto, dados que apontam evidências da construção da plataforma nanoestruturada, dando à invenção proposta, a aptidão para continuidade com os estudos de interação com os analitos-alvo (13), caracterizados pelas bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); e as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

47. O estudo da detecção dos analitos-alvo através da invenção proposta - plataforma biossensora nanoestruturada MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA - foi realizado utilizando a EIE como técnica eletroquímica padrão. 4µL da suspensão bacteriana em determinada concentração (10^1 a 10^6 UFC.mL⁻¹) foi adsorvida na superfície da plataforma biossensora proposta durante 4 minutos, para posterior análise dos espectros de impedância obtidos a partir dos diagramas de Nyquist, como demonstrado nas figuras 6 e 7, relacionadas à detecção das bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas, respectivamente. Destacando que após o processo de adsorção do microrganismo no biossensor, há a sucessiva aplicação de uma corrente, o qual é medida a impedância da mesma, cujo aumento e variação dessa impedância determina a concentração em que se encontra o analito, além de sua intensidade determinar a espécie em questão.

48. A figura 6 demonstra os espectros de impedância relativos a detecção da plataforma biossensora frente bactérias Gram-positivas. Na figura 6 (a), (b) e (c) é revelado os resultados impedimétricos referentes à detecção do *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente. Resumidamente, observa-se um aumento sequencial no diâmetro do semicírculo conforme a concentração do microrganismo em questão aumenta. Como pode se observar na figura 6 (d), estão correlacionados as cores dos espectros de impedância com seus respectivos semicírculos das bactérias Gram-positivas com a concentração detectada, como segue: espectro preto (22) apontando a concentração de 10^1 UFC.mL; espectro vermelho (23) para 10^2 UFC.mL; espectro azul (24) para 10^3 UFC.mL; espectro verde (25) para 10^4 UFC.mL; espectro rosa (26) para 10^5 UFC.mL e espectro amarelo (27) condizendo com 10^6 UFC.mL. O perfil de resposta elétrica obtido pelo biossensor após a interação com os microrganismos, foi, da menor para a maior: *B. subtilis* < *S. aureus* < *S. aureus* (ATCC 25923).

49. A figura 7 define os espectros de impedância relativos a detecção da plataforma biossensora frente bactérias Gram-negativas. A figura 7 (a), (b), (c), (d) e (e) referem-se aos resultados impedimétricos referentes à detecção da *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Escherichia coli* (ATCC 25922), respectivamente. Aqui também, como esperado, também foi visualizado um aumento sequencial no diâmetro do semicírculo conforme o aumento da concentração do microrganismo em teste. Similarmente ao modelo adotado na figura 6, na figura 7 (f) temos uma correlação das cores dos espectros de impedância com seus respectivos semicírculos das bactérias Gram-negativas com a concentração detectada: espectro preto (28) apontando a concentração de 10^1 UFC.mL⁻¹; espectro vermelho (29) para 10^2 UFC.mL⁻¹; espectro azul (30) para 10^3 UFC.mL⁻¹; espectro verde (31) para 10^4 UFC.mL; espectro rosa (32) para 10^5 UFC.mL e espectro amarelo (33) correlacionado a 10^6 UFC.mL. O padrão de resposta elétrica obtido pelo biossensor após a interação com os microrganismos, foi, da menor para a maior: *A. baumannii* < *E. coli* (ATCC 25922) < *P. aeruginosa* < *E. coli* < *K. pneumoniae*.

50. Os resultados obtidos representados pelas figuras 6 e 7, determinam, portanto, a capacidade de diferenciação interespecie de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas do biossensor através do peptídeo antimicrobiano ClavA (12), o elemento sensor, apontando uma propriedade qualitativa e quantitativa da invenção proposta. Em adição, detectou sensivelmente as diferentes concentrações de unidades formadoras de colônia de cada bactéria. Todas as três bactérias Gram-positivas apresentaram uma resposta eletroquímica menor que as cinco bactérias Gram-negativas, exibindo um padrão de resposta impedimétrica único para cada analito-alvo. Tal diferenciação se deu pelas características estruturais do peptídeo catiônico Clavanina A e de cada microrganismo, determinando, além do seu padrão de inserção em cada tipo de membrana bacteriana, uma resposta elétrica

correlacionada à carga relativa de superfície de cada espécie de microrganismo. Gram-positivas apresentam uma reduzida carga negativa de superfície devido a cationicidade atribuída a camada espessa de peptidoglicano presente em sua estrutura, em comparação com a camada fina e interna do mesmo polímero. Desta forma, são atribuídas às Gram-positivas uma menor resistência a transferência de carga (R_{ct}).

51. Na figura 8 observa-se o circuito equivalente de Randles, utilizado para a obtenção dos valores de impedância da plataforma biossensora, bem como os da detecção dos microrganismos pelo biossensor proposto. Tal circuito é composto pela resistência ôhmica (R_Ω) da solução eletrolítica (34), elemento de fase constante (CPE) (35), resistência a transferência de carga (R_{ct}) (36) e a impedância de Warburg (W) (37). Dele foram extraídos os valores de cada elemento do circuito, para a composição da tabela 2.

52. A figura 9 apresenta os valores dos elementos do circuito equivalente de Randles dos resultados de impedância do processo de biodetecção das bactérias pelo sistema sensor nanoestruturado MBA_Fe₃O₄@Au-Cys_ClavA. A figura 9 (a) refere-se aos valores apresentados bactérias Gram-positivas e a figura 9 (b) descreve os valores das bactérias Gram-negativas.

Referências

53. 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.

54. ANDRADE, C. A. S. et al. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2015.

55. FENWICK, A. Waterborne infectious diseases - Could they be consigned to history? **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1077–1081, 2006.

56. 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.

57. GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Journal Of Applied Biomedicine**, n. January, p. 57–64, 2008.

58. 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.

59. LI, Y. et al. Impedance based detection of pathogenic E. coli O157: H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 193–199, 2014.

60. 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.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

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

65. 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.

66. PANDEY, P. K. et al. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. **AMB express**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2014.

67. 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.

68. PRAVEEN, P. K. et al. Water-borne Diseases and its Effect on Domestic Animals and Human Health : A Review Water-borne Diseases and its Effect on Domestic Animals and Human Health : A Review. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 6, n. January, p. 242–245, 2016.

69. 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.

70. 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.

71. 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.

72. 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.

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

REIVINDICAÇÕES

1. DISPOSITIVO NANOSSENSOR configurado para a detecção de microrganismos, caracterizado por possuir:
 - (a) Substrato com superfície metálica;
 - (b) monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA);
 - (c) aplicação dos agentes acopladores EDC:NHS;
 - (d) nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ do tipo core-shell com a superfície modificada pela L-cisteína;
 - (e) peptídeo antimicrobiano Clavanina A.
2. DISPOSITIVO NANOSSENSOR, conforme reivindicação 1, caracterizado por terem eletrodos conectados a um potenciostato e circuito para medida da impedância.
3. DISPOSITIVO NANOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado por terem sistema preferível com 3 eletrodos inseridos em uma gaiola de Faraday.
4. DISPOSITIVO NANOSSENSOR, conforme reivindicação 3, caracterizado pelos 3 eletrodos serem um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um contra-eletrodo.
5. MÉTODO PARA OBTENÇÃO DO DISPOSITIVO NANOSSENSOR DA REIVINDICAÇÃO 1, caracterizado por:
 - (a) formação de monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), compreendendo a adsorção de MBA (concentração entre 1-15 mM) preparado em etanol absoluto, com posterior lavagem com água deionizada ultrapura para remoção de moléculas não ligadas;

(b) funcionalização de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ casca-núcleo (*core-shell*) por L-cisteína.

6. MÉTODO PARA CARACTERIZAÇÃO DE MONTAGEM DO DISPOSITIVO NANOSSENSOR DA REIVINDICAÇÃO 1, caracterizado por possuir as etapas:

- (a) Imersão dos eletrodos em uma solução de 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ com tampão fosfato (pH 7.4).
- (b) Aplicação das técnicas eletroquímicas voltametria cíclica (realizada com varredura entre -0.2 e 0.7 V) e espectroscopia de impedância eletroquímica nas frequências de 100 mHz a 100 kHz com amplitude e onda senoidal variando entre 1-15 mV.

7. MÉTODO DE PROCEDIMENTO APÓS PREPARO DO DISPOSITIVO NANOSSENSOR DA REIVINDICAÇÃO 1, caracterizado por possuir as etapas:

- (a) Inserção do dispositivo com plataforma biossensora nanoestruturada em um líquido com suspeita de conter microrganismos, ou aplicação do líquido sobre a superfície do eletrodo de trabalho com a plataforma biossensora nanoestruturada montada;
- (b) Tempo de adsorção de 1-20 minutos;
- (c) Lavagem da superfície do biossensor para remoção do analito não ligado.

8. MÉTODO PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE MICRORGANISMOS PELO DISPOSITIVO NANOSSENSOR DA REIVINDICAÇÃO 1, caracterizado por:

- (a) Adsorção da amostra líquida suspeita à plataforma biossensora nanoestruturada $\text{MBA_Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-Cys_ClavA}$ montada na superfície de ouro do eletrodo, de acordo com a reivindicação 7;

- (b) Inserção do eletrodo à célula eletroquímica contendo solução eletrolítica;
- (c) Submissão do biossensor à análise por espectroscopia de impedância eletroquímica, executando a análise pelos seguintes parâmetros: frequência de 100 mHz a 100 kHz com amplitude e onda senoidal variando entre 5-15 mV;
- (d) Determinação das variações dos espectros de impedância obtidas pelo biossensor após interação com amostra suspeita, medindo a condutividade elétrica do sistema sensor, aplicando um circuito eletrônico (circuito equivalente de Randles) para indicar a presença ou ausência dos analitos-alvo na amostra suspeita;
- (e) Avaliação dos diagramas de Nyquist obtidos após análise impedimétrica, verificando a intensidade dos espectros de impedância, bem como o diâmetro do semicírculo alcançado, averiguando a resistência à transferência de carga relativa ao analito presente na amostra líquida suspeita.

9. USO DO DISPOSITIVO NANOSSENSOR DA REIVINDICAÇÃO 1, onde os analitos-alvo são microrganismos, compreendendo bactérias, fungos, vírus, protozoários e helmintos.

10. USO DO DISPOSITIVO NANOSSENSOR DA REIVINDICAÇÃO 1 em diferentes tipos de substratos como óxido de índio dopado com estanho (ITO), ouro, prata, platina, pasta de carbono, etc., sob fins de aplicação no desenvolvimento de biossensores.

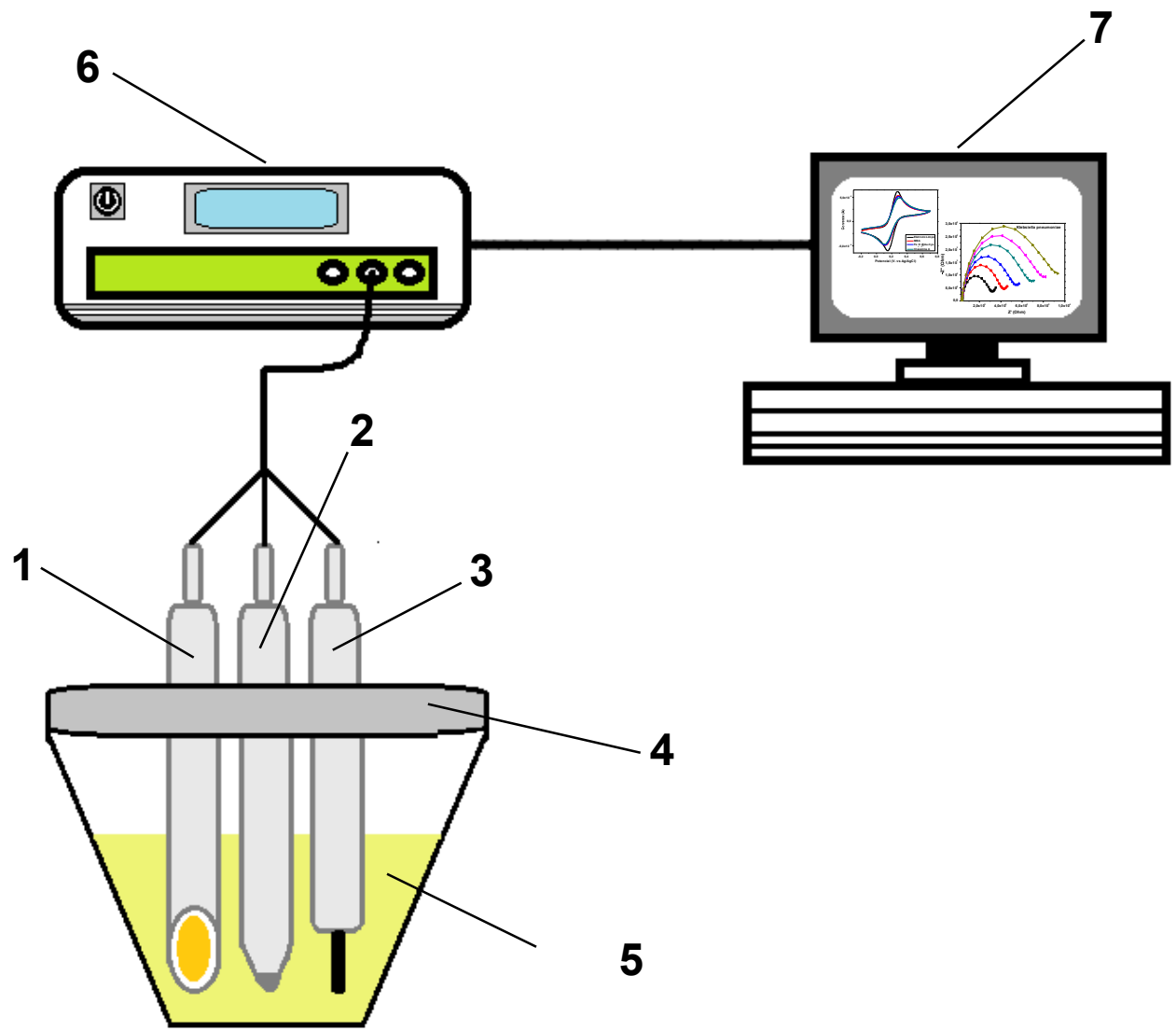


Figura 1

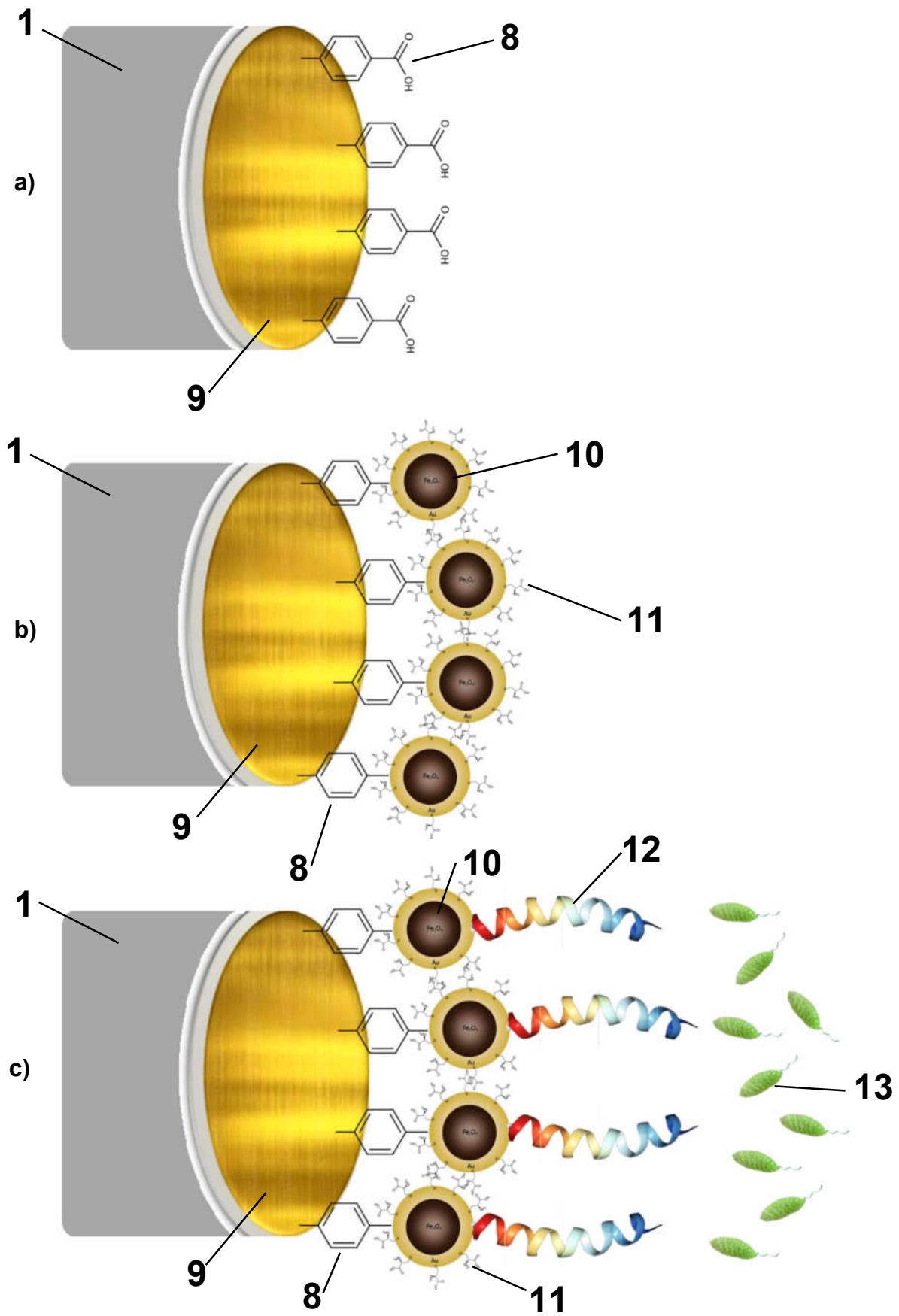


Figura 2

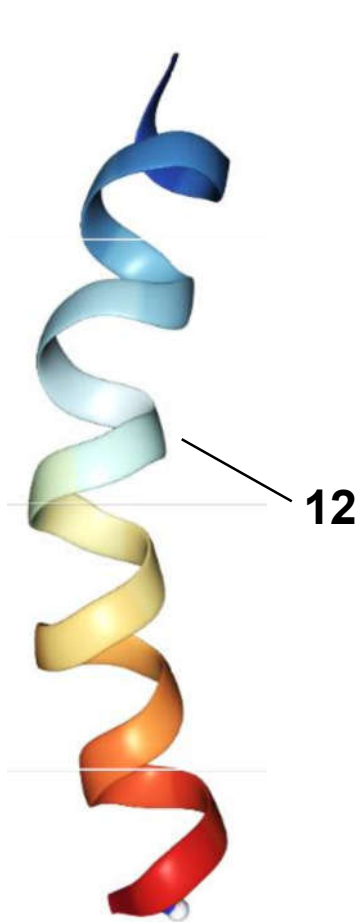


Figura 3

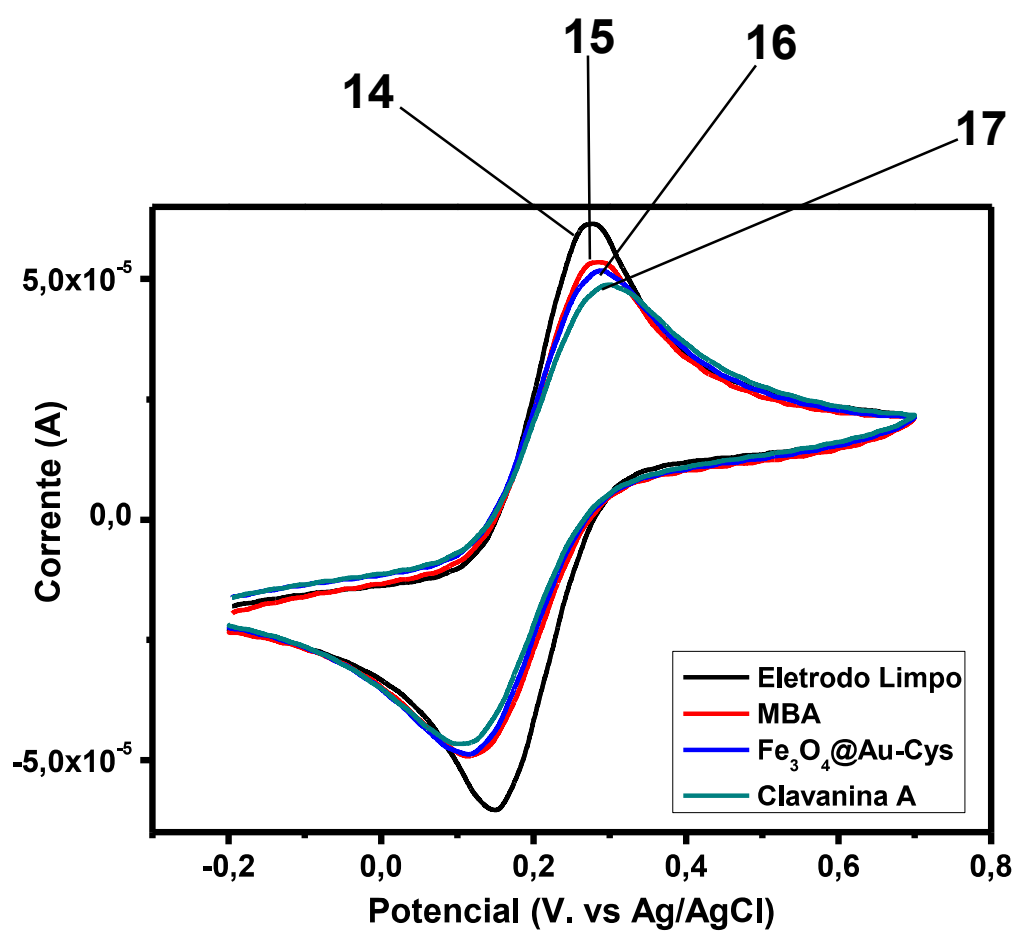


Figura 4

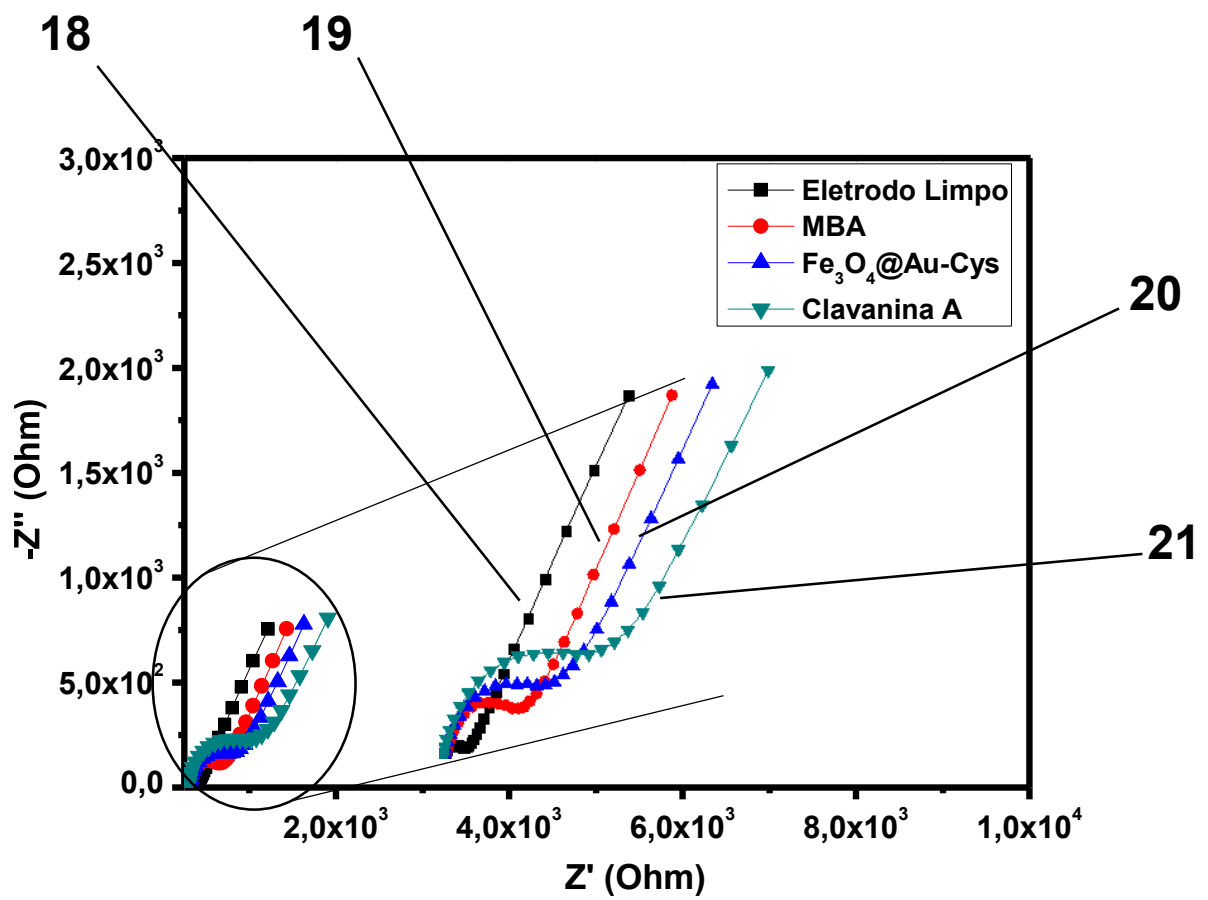


Figura 5

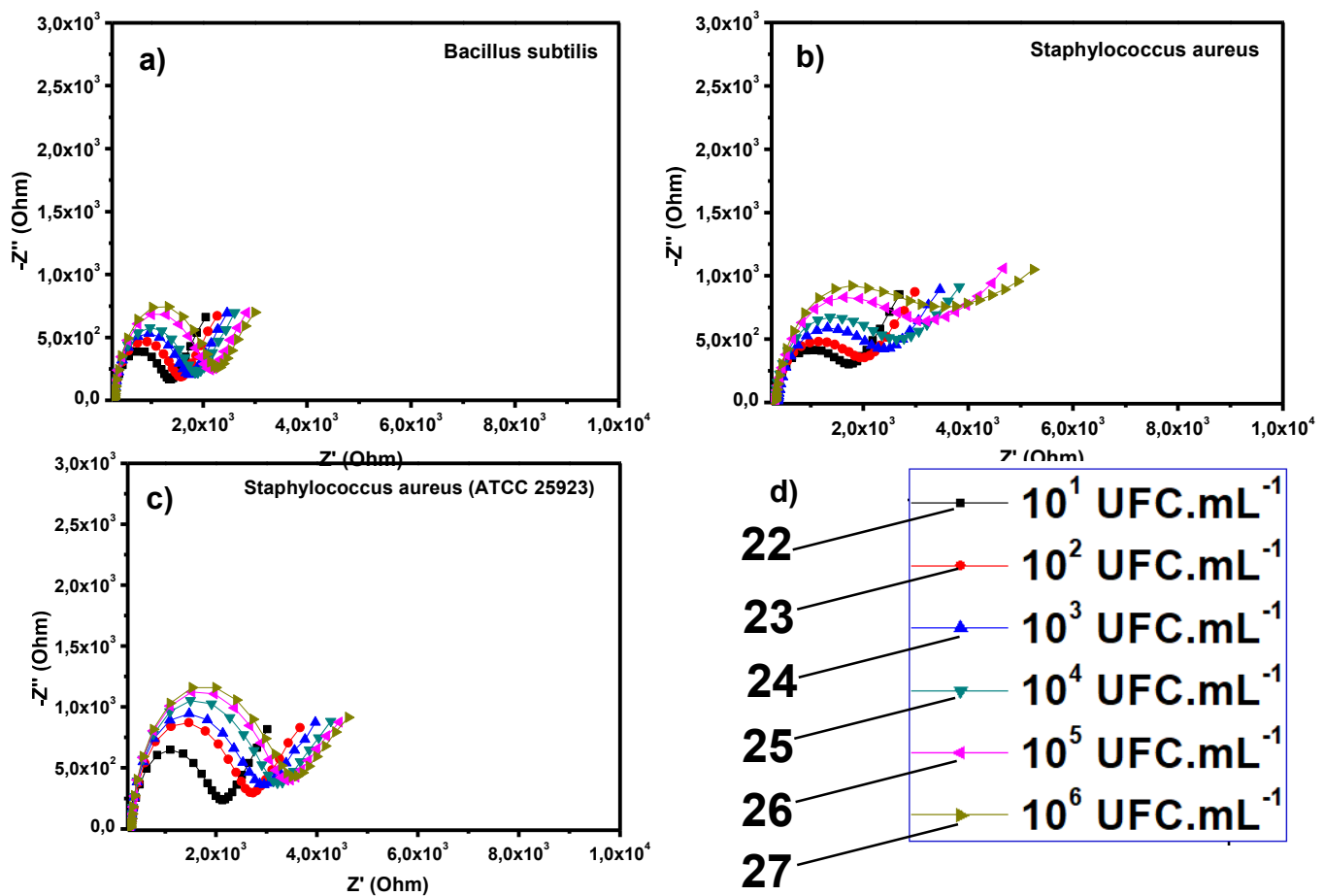


Figura 6

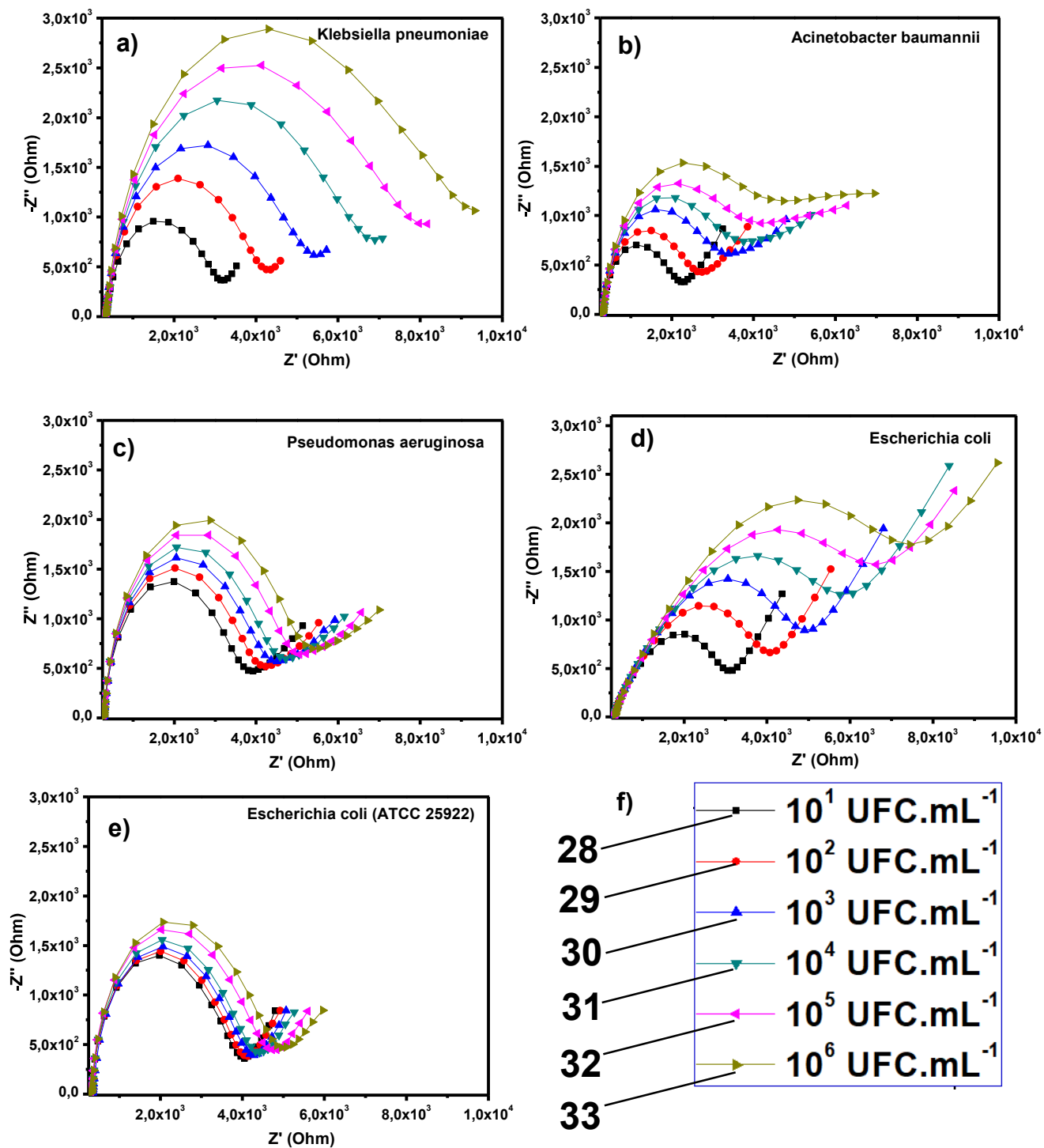


Figura 7

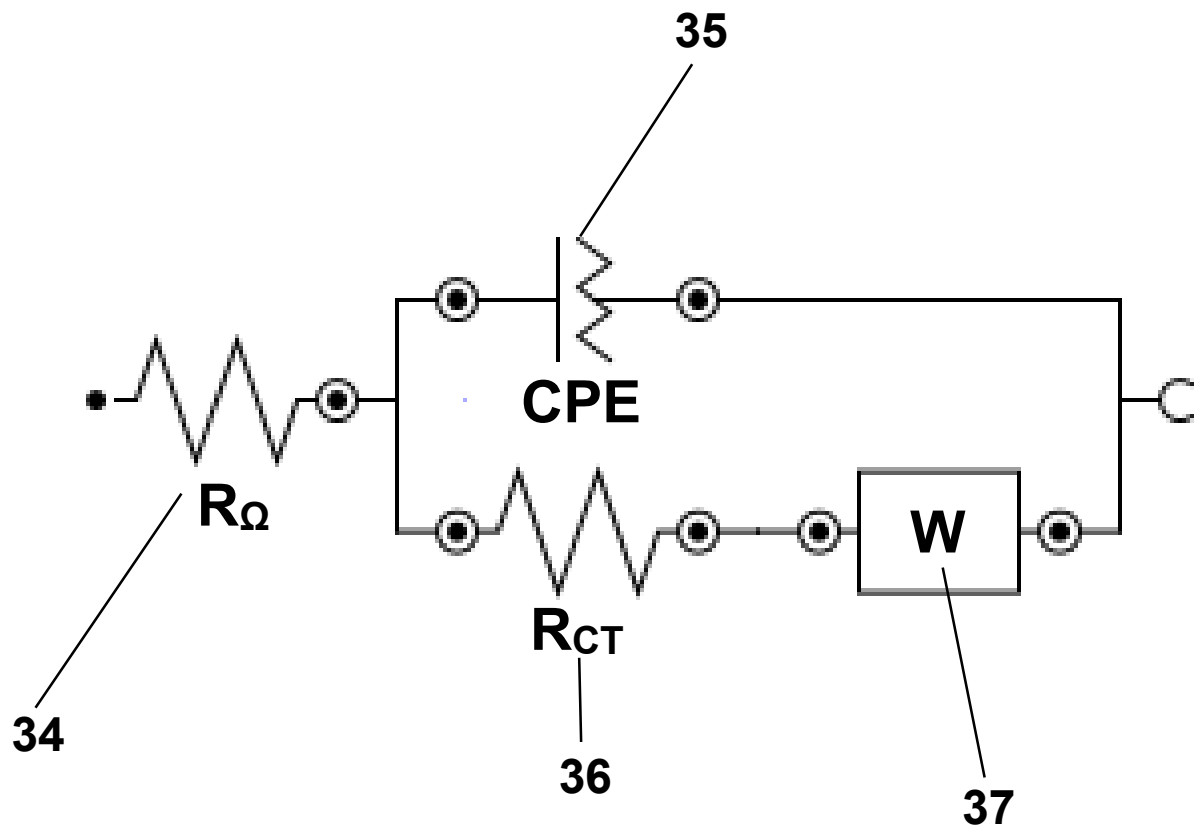


Figura 8

a)

Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R _{ct} (kΩ)	Q (μF)	n	R _Ω	W
<i>Bacillus subtilis</i>					
10 ¹	1,62	3,15	0,821	3,29	9,67
10 ²	1,77	3,18	0,823	3,24	9,5
10 ³	1,93	3,02	0,825	3,32	9,26
10 ⁴	2,03	2,9	0,828	3,31	8,9
10 ⁵	2,13	2,94	0,826	3,33	8,8
10 ⁶	2,29	2,91	0,825	3,63	8,69
<i>Staphylococcus aureus</i>					
10 ¹	1,70	1,59	0,844	3,15	9,56
10 ²	2,25	1,45	0,856	3,16	8,95
10 ³	2,47	1,5	0,852	2,95	8,02
10 ⁴	2,76	1,46	0,853	2,98	8,00
10 ⁵	2,92	1,40	0,857	3,03	8,03
10 ⁶	3,11	1,41	0,854	2,98	7,49
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 25923)</i>					
10 ¹	1,94	9,92	0,66	2,97	9,51
10 ²	2,38	1,06	0,65	2,98	9,16
10 ³	2,69	1,07	0,64	2,88	8,45
10 ⁴	3,29	1,14	0,63	2,99	8,02
10 ⁵	3,88	1,08	0,63	2,92	6,94
10 ⁶	4,35	1,08	0,62	2,78	6,31

b)

Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R _{ct} (kΩ)	Q (μF)	n	R _Ω	W
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
10 ¹	3,9	2,8	0,78	3,05	5,08
10 ²	4,89	2,83	0,78	3,12	4,05
10 ³	5,94	2,85	0,77	3,10	3,12
10 ⁴	7,61	3,85	0,72	1,17	2,62
10 ⁵	7,73	2,63	0,77	3,19	1,89
10 ⁶	7,81	2,26	0,78	3,12	1,67
<i>Acinetobacter baumannii</i>					
10 ¹	1,79	1,6	0,87	3,05	1,00
10 ²	2,31	2,45	0,82	2,99	7,76
10 ³	2,98	2,58	0,81	3,01	6,4
10 ⁴	3,05	2,72	0,81	3,03	3,39
10 ⁵	3,89	2,89	0,79	3,04	4,03
10 ⁶	4,52	2,84	0,79	2,99	4,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
10 ¹	3,43	8,25	0,880	2,75	6,82
10 ²	3,74	8,14	0,882	2,72	6,5
10 ³	4,00	8,06	0,885	2,84	6,08
10 ⁴	4,24	7,83	0,881	2,72	5,95
10 ⁵	4,58	7,80	0,889	2,8	5,73
10 ⁶	4,89	7,78	0,889	2,78	5,4
<i>Escherichia coli</i>					
10 ¹	3,62	5,19	0,702	3,18	6,06
10 ²	4,48	5,08	0,699	3,11	4,78
10 ³	4,95	5,99	0,670	4,4	4,41
10 ⁴	5,49	6,25	0,660	3,08	3,62
10 ⁵	6,26	5,46	0,660	3,28	3,62
10 ⁶	7,01	4,54	0,680	3,25	2,38
<i>Escherichia coli (ATCC 25922)</i>					
10 ¹	3,46	8,25	0,880	3,1	8,84
10 ²	3,53	8,04	0,891	3,21	8,63
10 ³	3,65	7,96	0,884	3,51	8,65
10 ⁴	3,8	7,81	0,893	3,23	8,37
10 ⁵	4,12	7,95	0,892	3,03	8,11
10 ⁶	4,33	7,86	0,891	3,02	7,63

RESUMO

DISPOSITIVO NANOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO ATRAVÉS DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO

A presente invenção é resultado de uma metodologia simples e rápida para a obtenção de um dispositivo direcionado para a detecção sensível de patógenos presentes em amostras líquidas. O método de montagem da plataforma nanoestruturada compreende a formação de monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) sobre o ouro do eletrodo, seguida de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ funcionalizadas com L-cisteína e do peptídeo antimicrobiano de origem marinha clavanina A (ClavA). Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, cuja natureza eletronegativa é diferenciada de acordo com a composição de suas paredes e membranas celulares, foram os analitos-alvo. Um método de avaliação da montagem da plataforma biossensora é descrito. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada como método para avaliar a detecção dos microrganismos, o qual acarreta na mudança da impedância, sendo específica para cada espécie de microrganismo em determinada concentração de unidades formadoras de colônia. O processo de montagem da plataforma nanossensora MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -Cys-ClavA dura em média 15 minutos, apresentando os resultados e diagnóstico entre 1-5 minutos. Ademais, o sistema sensor desenvolvido apresenta um limite de detecção de 10^1 a 10^6 UFC.mL⁻¹.

APÊNDICE B – PATENTE 2

“PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARO E USO DO MESMO”

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 017284 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO - UCDB

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 03226149001587

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Avenida Tamandaré, nº 6000, Jardim Seminário

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79117-900

País: BRASIL

Telefone: (67) 331 23300

Fax: (67) 331 23301

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARO E USO DO MESMO

Resumo: A presente invenção refere-se a uma plataforma biossensora para análise e identificação eletroquímica de microorganismos de interesse clínico, tendo como elemento de biorreconhecimento o peptídeo antimicrobiano de nome temporina-PTA (T-PTA). As técnicas espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC) são os métodos de escolha para rápida e sensível avaliação da detecção dos analitos-alvo. Em adição, a presente invenção refere-se a um processo de montagem da plataforma biossensora, bem como o uso do mesmo. O biossensor proposto apresenta em sua composição uma monocamada automontada de composto tiolado, nanopartículas magnéticas revestidas por ouro e 3-aminopropiltietoxissilano (APTES) e o peptídeo T-PTA. Em adição, a plataforma biossensora desenvolvida é capaz de detectar e diferenciar entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de detectar fungos do gênero *Candida* spp., apresentando limite de detecção de 101 UFC.mL⁻¹.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

CPF: 09575433440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Avenida Professor Artur de Sá, 1161, Várzea

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-525

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 484632

Fax:

Email: albertogaldino16@gmail.com

Inventor 2 de 8

Nome: ISAAC AARÓN MORALES FRIAS

CPF: 01821530454

Nacionalidade: Mexicana

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua José Nunes da Cunha, 378, Piedade

Cidade: Jaboatão dos Guararapes

Estado: PE

CEP: 54410-280

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 340834

Fax:

Email: iam.ibt@gmail.com

Inventor 3 de 8

Nome: MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA

CPF: 00966001443

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Estrada das Ubaias, nº 713, Apt. 302, Casa Forte

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52061-080

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 477541

Fax:

Email: m_danielly@yahoo.com.br

Inventor 4 de 8

Nome: REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

CPF: 03547189403

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Amália Bernadino de Souza, 670, apt. 1601, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51021-150

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 479644

Fax:

Email: goncalves_reginaldo@hotmail.com

Inventor 5 de 8

Nome: SANDRA REGINA DE SÁ

CPF: 08178824485

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua cento e oito, n 375, Jardim Paulista

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 53407-270

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 465133

Fax:

Email: gi_212@hotmail.com

Inventor 6 de 8

Nome: LUDOVICO MIGLIOLO

CPF: 04312172463

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Água Limpa Park

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79117-560

País: BRASIL

Telefone: (67) 981 110495

Fax:

Email: ludovico@ucdb.br

Inventor 7 de 8

Nome: PATRÍCIA SOUZA E SILVA

CPF: 03843965188

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Bairro Alto, n. 240, Santa Emília

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79093-610

País: BRASIL

Telefone: (67) 991 545931

Fax:

Email: patriciasouza1778@gmail.com

Inventor 8 de 8

Nome: CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE

CPF: 02431455432

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Estrada das Ubaías, nº 713, Apt. 302, Casa Forte

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52061-080

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 140044

Fax:

Email: csrandrade@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU e comprovante.pdf
Procuração	Procuração UCDB.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Quadro Reivindicatório.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A2BC1E0

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 13/04/2020

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

Bacillus subtilis
Enterococcus faecalis
Acinetobacter baumannii
Klebsiella pneumoniae
Candida albicans
Candida tropicalis

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARO E USO DO MESMO

Campo da invenção

[001] A invenção aqui descrita apresenta aplicabilidade na área de biossensores, tendo como alvo principal o diagnóstico clínico e laboratorial de patógenos causadores de graves infecções em humanos. Técnicas eletroquímicas foram utilizadas, visando promover a identificação de tais microrganismos. A invenção proposta consiste na imobilização do novo peptídeo antimicrobiano (AMP) chamado temporina-PTA (T-PTA) à superfície de nanopartículas magnéticas revestidas por ouro e 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), sendo ambas adsorvidas em um substrato metálico. Tal plataforma nanoestruturada tem como alvo elementar uma grande variedade de microrganismos, dentre eles bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.

[002] A nanotecnologia tem um papel fundamental no desenvolvimento de biossensores, promovendo aumento na sensibilidade e na eficiência de detecção do alvo terapêutico. Tais nanomateriais promovem a introdução de diferentes sinais de transdução elétricos, podendo então ser detectados através de técnicas como a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC), amplamente utilizadas na área de biossensores. Nanopartículas magnéticas como as usadas no presente trabalho dispõem de características atrativas no campo biomédico, cujo procedimento simples de síntese e elevada razão área-volume possibilitam a integração de moléculas biológicas ativas em sua estrutura, promovendo, portanto, a concepção de novos biomateriais tendo como propósito principal a aplicação na área da saúde.

[003] Salientamos que usamos de uma metodologia inovadora de biossensor por ser o primeiro protótipo descrito na literatura que faz uso do T-PTA com finalidades biossensores, capaz de detectar um amplo espectro de microrganismos de interesse clínico.

Fundamentos da invenção

[004] Infecções hospitalares (IH) permanecem sendo um problema de saúde pública. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), é indicado que anualmente cerca de 1,4 milhões de pessoas no mundo sofrem algum tipo de infecção no ambiente hospitalar, resultando em 80 mil mortes (NAZIR; KADRI, 2014).

[005] Em sua maioria, tais infecções ocorrem em países em desenvolvimento, associado ao ineficaz saneamento básico local e infraestrutura hospitalar precária (KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). Em adição, a falta de políticas públicas informativas, bem como a contaminação cruzada desencadeada entre paciente-visitantes e da própria mão e roupas dos agentes de saúde (médicos, enfermeiros, etc.) promovem a colonização de microrganismos patogênicos no paciente já debilitado, sucedendo sua permanência no local e maior probabilidade de piora de quadro clínico (DEL CAMPO et al., 2019; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

[006] Existe uma grande variedade de microrganismos que podem causar infecções no ambiente hospitalar, enfatizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Maior ressalva é dada às bactérias, pois representam cerca de 90% dos casos de IH no mundo (BEREKET et al., 2012; KHAN; AHMAD; MEHBOOB, 2015). Dentre as Gram-positivas, podemos destacar o *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*. Em relação às Gram-negativas, cuja presença remete a maior gravidade do caso de IH, sobressai-se a *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (AGARWAL; SHIAU; LARSON, 2018).

[007] Alguns dos métodos de diagnóstico presuntivo mais utilizados são os tradicionais meios de cultura sólidos, semissólidos e caldos nutritivos seletivos e específicos, reações antígeno-anticorpo desencadeadas por testes como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e testes moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas variáveis (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015; VERMA; SAXENA; BABU, 2013).

[008] Como alternativa aos métodos tradicionais, biossensores eletroquímicos se destacam como uma inovadora ferramenta de análise de analitos de interesse clínico. O primeiro biossensor proposto por Clark e Lyons datado na década de 50 abriu novas

portas na área diagnóstica, cuja utilidade se expandiu para diversas áreas, sobretudo a da saúde (SALEEM, 2013). A estrutura básica de um biossensor compreende um elemento de capacidade sensora biológica ativa que apresenta especificidade ao analito-alvo (ex: peptídeos, enzimas, fragmentos de DNA, RNA, etc.), um transdutor com o papel de “traduzir” a interação **elemento sensor** → **analito** em um sinal detectável (ex: eletroquímico, óptico, acústico, etc.), um processador de sinal e um software para análise de dados (PERUMAL; HASHIM, 2014).

[009] Transdutores eletroquímicos se destacam entre as demais opções devido ao baixo custo de equipamentos associado a sensibilidade na avaliação de reações químicas ocorrendo na interface existente entre um condutor de elétrons e um eletrólito (FARIDBOD; NOROUZI; GANJALI, 2015). Em adição, técnicas voltamétricas na figura da VC e impedimétricas como a EIS configuram-se como ferramenta inovadora na área médica-diagnóstica, conferindo fácil entendimento de análise de resultados de biossensores. Basicamente, avaliam as mudanças físico-químicas que ocorrem na interface de uma solução eletrolítica que funciona como um par redox e um eletrodo de trabalho cuja superfície foi modificada por uma plataforma sensora nanoestruturada especificamente para determinado analito. Os valores de resistência a transferência de carga (R_{CT}), cuja variação denota a interação dos componentes da plataforma sensora com o substrato, mas principalmente o evento da ligação do elemento sensor com o analito alvo (ex: fragmento de DNA e sequência complementar, inserção de um peptídeo na parede celular microbiana, etc.), sendo esta interação proporcional a concentração do alvo terapêutico (LISDAT; SCHÄFER, 2008).

[0010] Peptídeos com atividade antibiótica tornaram-se uma alternativa moderna frente ao persistente problema da resistência a antimicrobianos, uma vez que apresentam seletividade singular a microrganismos, sendo inativas diante de células sanguíneas (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010). Tal atividade singular abre portas para diferentes aplicações, como na área de biossensores, uma vez que a estrutura de um PAM favorece uma forte interação com membrana microbiológicas, sendo, portanto, utilizadas como biomaterial de reconhecimento. Ademais, as peculiaridades da estrutura microbiana permitem que os peptídeos explorados pela técnica eletroquímica sejam

capazes de diferenciar entre bactérias Gram-positivas e Gram-positivas (SILVA JUNIOR et al., 2018).

[0011] Muito empenho tem se criado para a identificação de microrganismos, resultando em inúmeros estudos. Por exemplo, a patente **WO 2018102350** determinou o desenvolvimento de um sensor microbiano baseado de nanopartículas magnéticas oxidadas (Fe_2O_3) modificadas por bacteriófagos, tendo como alvo as bactérias *E. coli* e *Listeria monocytogenes*.

[0012] Em adição a patente **US 20160223538** demonstrou um sensor eletroquímico de microeletrodos interdigitados com o PAM magainina 1 para a detecção de *E. coli*. O peptídeo foi modificado com um grupo funcional o deixando capaz de interagir diretamente com o eletrodo sem a presença de monocamadas automontadas de tióis ou polímeros condutores, bem como sem a presença de nanopartículas metálicas.

[0013] Além do supracitado, a patente **US 20170030907** traz um sensor com monocamadas automontadas de ácido mercaptoundecanóico (MUA) adsorvidos em eletrodo de ouro e receptor toll-like 4 humano (TLR-4), uma proteína usada como elemento sensor capaz de detectar lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias Gram-negativas. Seu analito-alvo era a *Salmonella typhimurium*.

[0014] Ademais, pode-se citar as patentes **WO 2007016467** e **US 20060228738** que tem como característica principal a detecção de fragmentos de DNA de microrganismos em amostras líquidas. O primeiro exemplo utilizou de uma modificação de um chip com nanopartículas de silício em nanoporos na forma de monocamada para detecção de *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Campylobacter*, *S. aureus* e *Clostridium perfringens*. Por outro lado, a segunda invenção trouxe um eletrodo com revestido com uma monocamada do polímero condutor polipirrol para identificação de *E. coli*. Vale a pena ressaltar que nesses estudos foi utilizado apenas avaliação voltamétrica.

[0015] A invenção aqui proposta se diferencia das anteriormente citadas pelo fato de ser a única que utiliza monocamadas automontadas de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), nanopartículas magnéticas revestidas por ouro ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$) e o peptídeo temporina-PTA para detecção e diferenciação de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos por meio da VC e EIS.

Breve descrição dos desenhos

[0016] A Figura 1 apresenta uma representação esquemática ilustrando o processo de montagem da plataforma biossensora.

[0017] A Figura 2 apresenta os resultados voltamétricos e impedimétricos do processo de montagem da plataforma biossensora. As medidas foram realizadas após cada etapa de aplicação dos componentes.

[0018] A Figura 3 apresenta graficamente os resultados de detecção dos microorganismos referentes à análise por voltametria cíclica.

[0019] A Figura 4 apresenta graficamente os resultados de detecção dos microorganismos referentes à análise por espectroscopia de impedância eletroquímica. Essa análise ocorre imediatamente após o estudo voltamétrico.

Descrição da invenção

[0020] A primeira etapa da invenção consiste na síntese das nanopartículas magnéticas e seu recobrimento com ouro coloidal, finalizando com a funcionalização com APTES.

[0021] As Fe_3O_4 foram sintetizadas através do método de co-precipitação. Cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em concentrações predeterminadas foram depositados em um béquer e recobertos com água deionizada ultrapura (50-150 mL). A solução foi mantida em agitação magnética entre 50-70°C durante 1-5 horas. Em seguida, 5-25 mL de hidróxido de amônia (NH_4OH) é adicionado, resultando na mudança de cor da solução de marrom para preta, indicando a obtenção das nanopartículas magnéticas. A solução é mantida em agitação por mais 1-5 horas. Por fim, o precipitado é recolhido com o auxílio de um ímã, sendo lavado 6 vezes em água deionizada e etanol e seco em estufa.

[0022] A obtenção da nanopartícula modificada pelo ouro e APTES se deu utilizando 100 mg do Fe_3O_4 e unindo ao ácido tetracloreáurico (HAuCl_4) em 10-100 mM. A solução foi disposta em banho ultrassônico durante 10-60 min, seguido de agitação magnética (10-60 min). O $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ é finalmente obtido através da redução do Au^{3+} pela glicose

(10-100 mM), no qual a solução se manteve em agitação magnética por 1 hora. As nanopartículas são por fim recolhidas por um ímã e lavadas em água deionizada.

[0023] A modificação das $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ pelo APTES ocorre unindo 50-500 mg das nanopartículas a 50-500 mL de etanol contendo APTES a 1-15 mM. A solução foi mantida em agitação magnética, aquecida a 30-50°C durante 24h. Após o período de modificação, a nanopartícula finalizada é lavada em água deionizada e etanol.

[0024] O peptídeo antimicrobiano temporina-PTA ($\text{FFGSVLKLIPKIL-NH}_2$) que se encontra liofilizado é diluído em água deionizada ultrapura na molaridade de 100-900 mM e homogeneizado.

[0025] A construção do biossensor proposto segue o seguinte processo: Um eletrodo de trabalho com superfície metálica, preferencialmente ouro, é utilizada na montagem da plataforma biossensora. Inicialmente, o eletrodo é lixado em feltro e alumina, seguido de limpeza em água deionizada e NaClO , finalizando com banho ultrassônico. Após limpeza do eletrodo, o padrão voltamétrico e impedimétrico do eletrodo limpo é avaliado, mergulhando o mesmo em uma solução de 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ preparado em tampão fosfato (pH 7). Esta mesma solução será utilizada na avaliação de montagem do biossensor, bem como na análise da detecção dos analitos-alvo.

[0026] A primeira etapa de montagem da plataforma sensora consiste na adição do ácido 4-mercaptobenzóico (MBA) entre 10-100 mM dissolvido em solução alcoólica. O eletrodo de trabalho é depositado na solução durante 10-60 min para formação da monocamada automontada de MBA, que servirá como âncora para os demais componentes do sensor, além de trazer estabilidade à estrutura.

[0027] Em seguida, os agentes acopladores N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (0.4 M EDC - 0.1 M NHS, 1:1, v/v) são adicionados ao MBA presente na superfície do eletrodo, visando a ativação dos grupos carboxílicos livres do MBA a ser ligado ao próximo componente do biossensor, as nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au-APTES}$, rica em grupamentos amina livres provenientes do APTES.

[0028] A última etapa de montagem do biossensor consiste da adição de glutaraldeído 5-25%, com a finalidade de se ligar aos grupamentos amina livres do APTES ao grupo amina presente na extremidade N-terminal da estrutura do peptídeo antimicrobiano T-PTA.

[0029] Diferentes tipos e espécies de microorganismos foram estudados para avaliar a sensibilidade do sistema sensor proposto MBA_ Fe_3O_4 @Au-APTES_T-PTA. Bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*), Gram-negativas (*Acinetobacter baumannii*) e duas espécies de fungos do gênero *Candida* (*Candida albicans* e *Candida krusei*). As bactérias foram semeadas em ágar Mueller Hinton, enquanto que os fungos foram semeados em Ágar Sabouraud. Os microorganismos foram incubados durante 24 h a 37°C.

[0030] Cada inóculo isolado é recolhido e disposto em solução salina esterilizada e posteriormente mergulhado em tampão fosfato pH 7, seguido a separação em diferentes concentrações na forma de UFC.mL, de acordo com a escala de McFarland (10^1 a 10^5 UFC.mL). UV-vis é utilizado para obtenção das concentrações descritas, na densidade óptica de 60 nm e ajuste para 0.50.

[0031] Para avaliar a ação do biossensor contra o analito-alvo (microorganismos), cada espécie da suspensão microbiana é adsorvida na superfície do biossensor durante 5-30 minutos. O eletrodo então é lavado para remoção dos microorganismos não ligados.

[0032] A caracterização de montagem da plataforma biossensora, bem como do evento de interação da mesma com os microorganismos, foi realizada por meio da técnica eletroquímica. Um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N (Ecochemie, Holanda) foi utilizado para a realização das análises voltamétricas e impedimétricas.

[0033] VC e EIS foram conduzidos em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: um eletrodo de trabalho com superfície de ouro (ET); um eletrodo de referência saturado com KCl 3M (ER) e um eletrodo auxiliar de platina (EA). Os eletrodo são imersos na solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 10mM) em tampão fosfato (pH 7).

[0034] VC tem como parâmetros principais potencial de -0,2 a 0,7 com uma taxa de varredura de 50 mV.s^{-1} e EIS foi conduzido na frequência de 100 mHz a 100 kHz com

amplitude e onda senoidal de 1-25 mV. Todas análises foram realizadas no interior de uma gaiola de Faraday.

Exemplos de concretizações da invenção

[0035] A invenção proposta apresenta uma plataforma biossensora de composição única, inovadora e de fácil preparo e manuseio, cuja elevada sensibilidade se dá por meio dos componentes estruturais da mesma.

[0036] Superfícies metálicas como o ouro permite a sua funcionalização através da adsorção de compostos tiolados como a cisteína, MBA, etc., favorecendo a criação de monocamadas automontadas, altamente estáveis e reprodutíveis. Tal monocamada permite a ligação de nanopartículas e materiais bioativos, como o $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ e do peptídeo T-PTA.

[0037] Desta forma, como primeiro componente do biossensor, o MBA se destaca entre as demais opções de tióis para a formação de monocamadas automontadas devido ao anel aromático presente em sua estrutura, que auxiliará na migração da corrente de elétrons, além de apresentar um grupamento carboxílico livre em sua extremidade, permitindo se ligar a inúmeros compostos de origem natural ou sintética.

[0038] Polímeros naturais e sintéticos podem ser utilizados na ancoragem de elementos sensores que tem o papel de biorreconhecimento frente o analito-alvo. Entretanto, se tratando de uma plataforma nanoestruturada eletroquímica, nanopartículas metálicas, sobretudo as magnéticas e com a presença de ouro é preferível. Nanopartículas metálicas dispõem da vantagem de favorecerem a migração da corrente de elétrons da solução eletrolítica redox (geralmente ferro/ferricianeto de potássio) para a superfície do eletrodo onde está montada a plataforma sensora. Dessa forma, as nanopartículas magnéticas revestidas por ouro ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$) utilizadas promoveram um aumento na sensibilidade do biodispositivo desenvolvido, elevando, por sua vez, a resposta eletroquímica avaliada pela VC e EIS, culminando na melhor diferenciação entre as espécies e tipo de microorganismos.

[0039] Inicialmente utilizados como solução inovadora no combate a resistência a antibióticos, os peptídeos antimicrobianos tiveram seu uso expandido a outras áreas, sobretudo a diagnóstica. O peptídeo T-PTA explorado no biodispositivo desenvolvido permite a detecção e diferenciação de microorganismos patogênicos devido às diferenças presentes na composição da parede celular microbiana. Bactérias Gram-positivas possuem uma camada externa de peptidoglicano, resultando em uma superfície mais eletropositiva em comparação com as Gram-negativas, cuja superfície mais eletronegativa é mais atraída à elevada cationicidade do peptídeo T-PTA.

[0040] Essas diferenças de carga na superfície dos microorganismos associadas à sua composição lipídica resultará na inserção do peptídeo na parede celular. Dessa forma, a interação peptídeo-microorganismo a ser avaliada pela VC e EIS tem a vantagem de poder diferenciar entre Gram-positivas e Gram-negativas, além de permitir a detecção de fungos.

[0041] Quando comparado com métodos tradicionais como os meios de cultura sólidos, semissólidos e caldos nutritivos, o biossensor desenvolvido tem a vantagem de detectar outros tipos de microorganismos (como protozoários), além de ter um limite de detecção de 10^1 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de solução. Em adição, por apresentar componentes nanoestruturados, a plataforma biossensora tem a vantagem de ser integrada a dispositivos portáteis miniaturizados, favorecendo seu uso para finalidades clínicas e de pesquisa.

[0042] A Tabela abaixo apresenta os valores dos componentes do circuito equivalente de Randles, obtidos a partir dos espectros de impedância dos diagramas de Nyquist obtidos através da análise por EIS. Podemos destacar os valores do R_{CT} , a resistência a transferência de carga apresentada após interação com determinado microorganismo em diferentes concentrações (10^1 a 10^5 UFC.mL⁻¹). Pode-se observar que os valores de R_{CT} foram crescentes à medida que a concentração do microorganismo na suspensão aumenta. Também é perceptível que maiores valores de R_{CT} foram obtidos pelas bactérias Gram-negativas, justamente devido à carga de superfície ser mais eletronegativa quando comparado com as Gram-positivas, que possui uma camada espessa de peptidoglicano que confere a elas uma relativa presença de cargas positivas. Dessa forma, há maior interação entre a eletronegatividade das Gram-negativas e a

elevada cationicidade do peptídeo Temporina-PTA, seguindo a permeabilização da parede celular. Portanto, destaca-se a capacidade do biossensor desenvolvido de diferenciar as bactérias entre classes.

Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R _{ct} (kΩ)	Q (μF)	n	R _Ω	W
<i>Bacillus subtilis</i>					
10 ¹	0,78	1,35	0,885	0,297	1,51
10 ²	1,22	1,24	0,896	0,308	1,49
10 ³	1,60	1,19	0,900	0,303	1,43
10 ⁴	1,76	1,19	0,898	0,306	1,39
10 ⁵	2,68	0,767	0,9	0,334	0,77
<i>Enterococcus faecalis</i>					
10 ¹	0,67	1,57	0,882	0,288	1,49
10 ²	0,86	1,42	0,892	0,284	1,51
10 ³	1,09	1,36	0,893	0,288	1,45
10 ⁴	1,27	1,31	0,896	0,284	1,48
10 ⁵	1,47	1,25	0,901	0,291	1,45
<i>Acinetobacter baumannii</i>					
10 ¹	1,16	1,33	0,874	0,280	1,41
10 ²	1,50	1,19	0,891	0,266	1,46
10 ³	1,90	1,10	0,898	0,268	1,40
10 ⁴	2,20	1,06	0,901	0,277	1,36
10 ⁵	2,57	1,03	0,903	0,271	1,31
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
10 ¹	1,32	0,836	0,908	0,274	1,41
10 ²	2,10	0,762	0,918	0,278	1,29
10 ³	2,70	0,740	0,917	0,303	1,18
10 ⁴	3,07	0,722	0,922	0,274	1,11
10 ⁵	3,57	0,710	0,924	0,286	1,03
<i>Candida albicans</i>					
10 ¹	0,77	1,59	0,871	0,309	1,43
10 ²	1,25	1,36	0,886	0,302	1,36
10 ³	1,57	1,26	0,892	0,305	1,35
10 ⁴	1,87	1,22	0,894	0,317	1,28
10 ⁵	2,17	1,21	0,895	0,299	1,26
<i>Candida tropicalis</i>					
10 ¹	0,72	1,35	0,886	0,286	1,53
10 ²	0,99	1,24	0,893	0,279	1,49
10 ³	1,21	1,17	0,898	0,278	1,44
10 ⁴	1,42	1,13	0,900	0,288	1,39
10 ⁵	1,66	1,07	0,905	0,283	1,35

[0043] O biossensor aqui proposto foi capaz de detectar e diferenciar entre 6 diferentes microorganismos, a saber bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*) bactérias Gram-negativas (*Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungos como leveduras do gênero *Candida* spp. (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*), cujo limite de detecção de 10¹ UFC.mL⁻¹ se destaca quando comparado com métodos tradicionais ou outros biossensores voltados à detecção microbiana, uma vez que a análise eletroquímica é de fácil compreensão, além de fácil e rápida montagem da

plataforma biossensora (em média 50 minutos + 10 minutos de análise da amostra com suspeita de contaminação com microorganismos). Em adição, é importante ressaltar que o biossensor desenvolvido pode ser direcionado a outras espécies de bactérias e fungos, além de outros microorganismos, como protozoários.

[0044] O biossensor desenvolvido tem amplo escopo de tipo de amostras que podem ser analisadas, a saber água, saliva, sangue, urina, etc., sendo necessário apenas 5 minutos para a ligação do microorganismo (se houver o contaminante na amostra suspeita) e 10 minutos da análise voltamétrica e impedimétrica. Tal rapidez oferecida pela presente invenção tem amplo valor clínico, uma vez que o paciente receberá o tratamento mais adequado de maneira imediata, reduzindo os custos de permanência hospitalar.

REIVINDICAÇÕES

1. PLATAFORMA BIOSSENSORA DE MICROORGANISMOS caracterizado por possuir três eletrodos independentes, em que:

- o eletrodo de trabalho possui uma superfície metálica, preferencialmente ouro, modificado por uma monocamada automontada de um composto tiolado, de preferência o ácido 4-mercaptobenzóico, nanopartículas magnéticas revestidas por ouro e peptídeo antimicrobiano, podendo ser de qualquer tipo ou origem (natural ou sintética), sendo preferivelmente o peptídeo temporina-PTA (FFGSVLKLIPKIL-NH₂);

- o eletrodo de referência é um eletrodo de Ag/AgCl saturado em cloreto de potássio 3 M;

- o eletrodo auxiliar é um fio de platina.

2. PLATAFORMA BIOSSENSORA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por terem os eletrodos conectados a um potenciostato e circuito para medida da espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica, no interior de uma gaiola de Faraday.

3. PLATAFORMA BIOSSENSORA, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado por apresentar limite de detecção entre 10^1 a 10^6 unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹).

4. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS REVESTIDAS POR OURO E 3-AMINOPROPILTRIETOXISILANO (APTES), de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela síntese de Fe₃O₄ pelo método de co-precipitação utilizando preferivelmente cloreto férrico (FeCl₃.6H₂O) e sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O), seguido da modificação das nanopartículas pelo ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) e redução pela glicose, e por fim, modificação superficial por APTES, dando origem às nanopartículas Fe₃O₄@Au-APTES.

5. PROCESSO PARA PREPARO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA conforme definido na reivindicação 1, caracterizado por apresentar a etapas de:
- (a) Lavar o eletrodo de trabalho em feltro e alumina, seguido de banho em água deionizada e NaClO, finalizando com banho ultrassônico;
 - (b) Funcionalizar a superfície metálica do eletrodo de trabalho com o composto tiolado, obtendo uma monocamada automontada para ancorar os demais componentes da plataforma biossensora;
 - (c) Ligação das nanopartículas magnéticas, preferencialmente $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -APTES, auxiliando na migração da corrente de elétrons e na ancoragem do peptídeo;
 - (d) Adsorção de peptídeo antimicrobiano.
6. PROCESSO PARA PREPARO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que, na etapa (b), o eletrodo de trabalho é mergulhado de 5 a 60 min, preferencialmente 10 min, em uma solução contendo de 10 a 50 mM, preferencialmente 30 mM, de ácido 3-mercaptopbenzóico.
7. PROCESSO PARA PREPARO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que, na etapa (c), as nanopartículas de material metálico, preferencialmente $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ -APTES, são inicialmente funcionalizadas pelo agentes acopladores N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (0.4 M EDC - 0.1 M NHS, 1:1, v/v) e seguidamente adsorvidas no eletrodo de trabalho durante 5 a 60 min, preferencialmente 10 min.
8. PROCESSO PARA PREPARO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que, na etapa (d), o elemento de biorreconhecimento de microorganismos seja um peptídeo antimicrobiano, preferencialmente, o peptídeo temporina-PTA. Glutaraldeído 10% é utilizado antes

da ligação do peptídeo, ligando-o às nanopartículas magnéticas. O tempo de adsorção é de 5 a 60 min, preferencialmente 10 minutos.

9. PROCESSO PARA PREPARO DA PLATAFORMA BIOSENSORIA, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por, após cada etapa de montagem da plataforma biosensora, o eletrodo de trabalho é lavado em água deionizada para remoção de agentes não ligados.
10. USO DA PLATAFORMA BIOSENSORIA, conforme definido nas reivindicações 1 e 3, caracterizado pelo fato de ser direcionado para detecção de microrganismos, dentre eles bactérias, fungos e protozoários.

DESENHOS

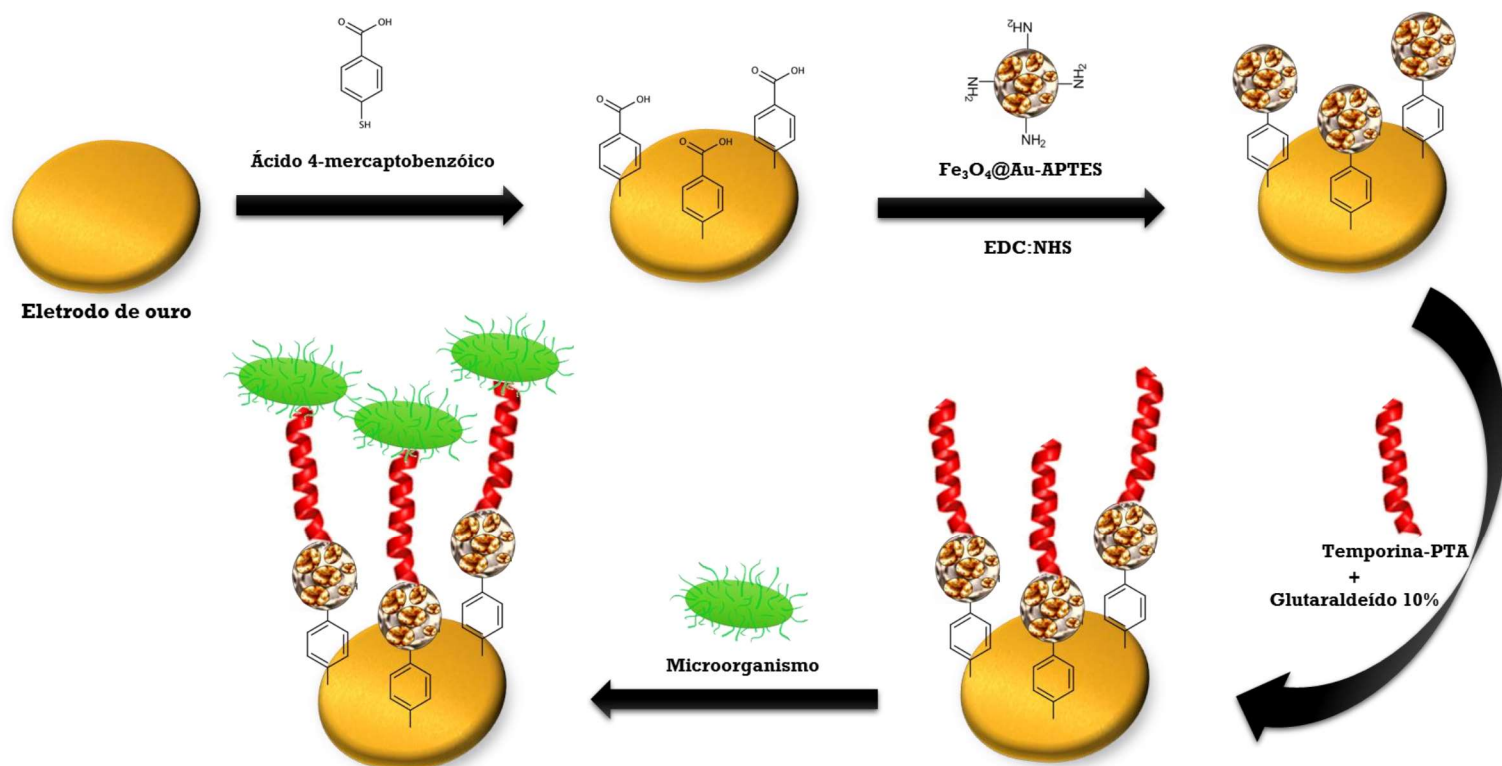


Figura 1

2 / 4

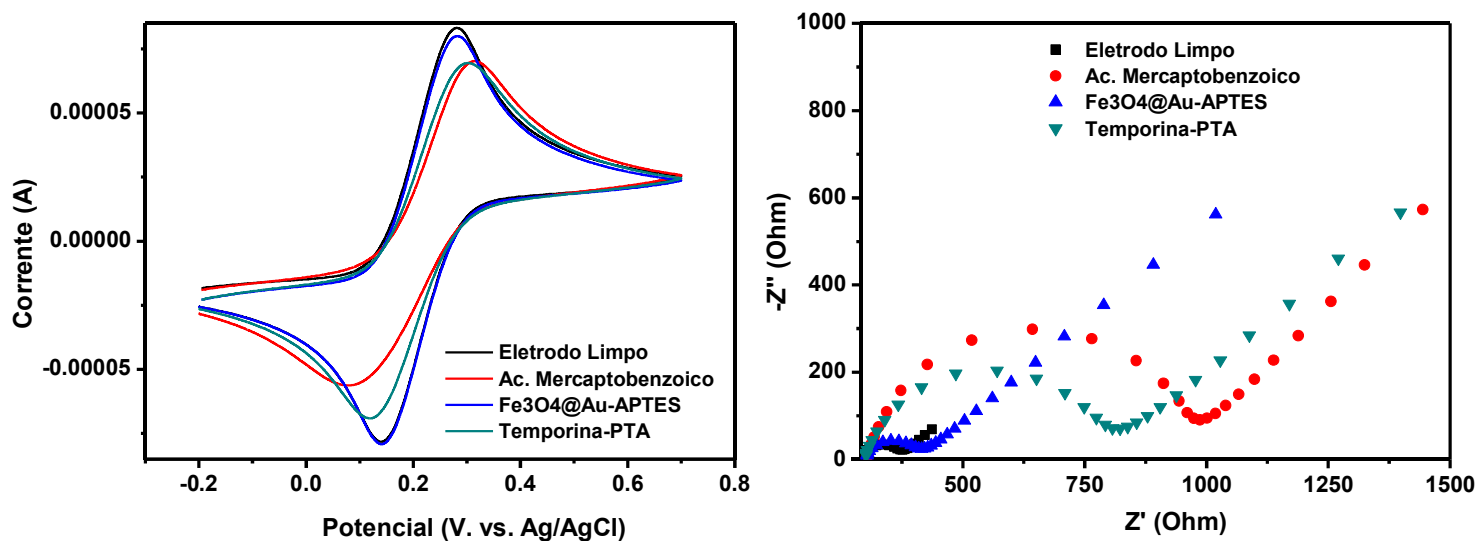


Figura 2

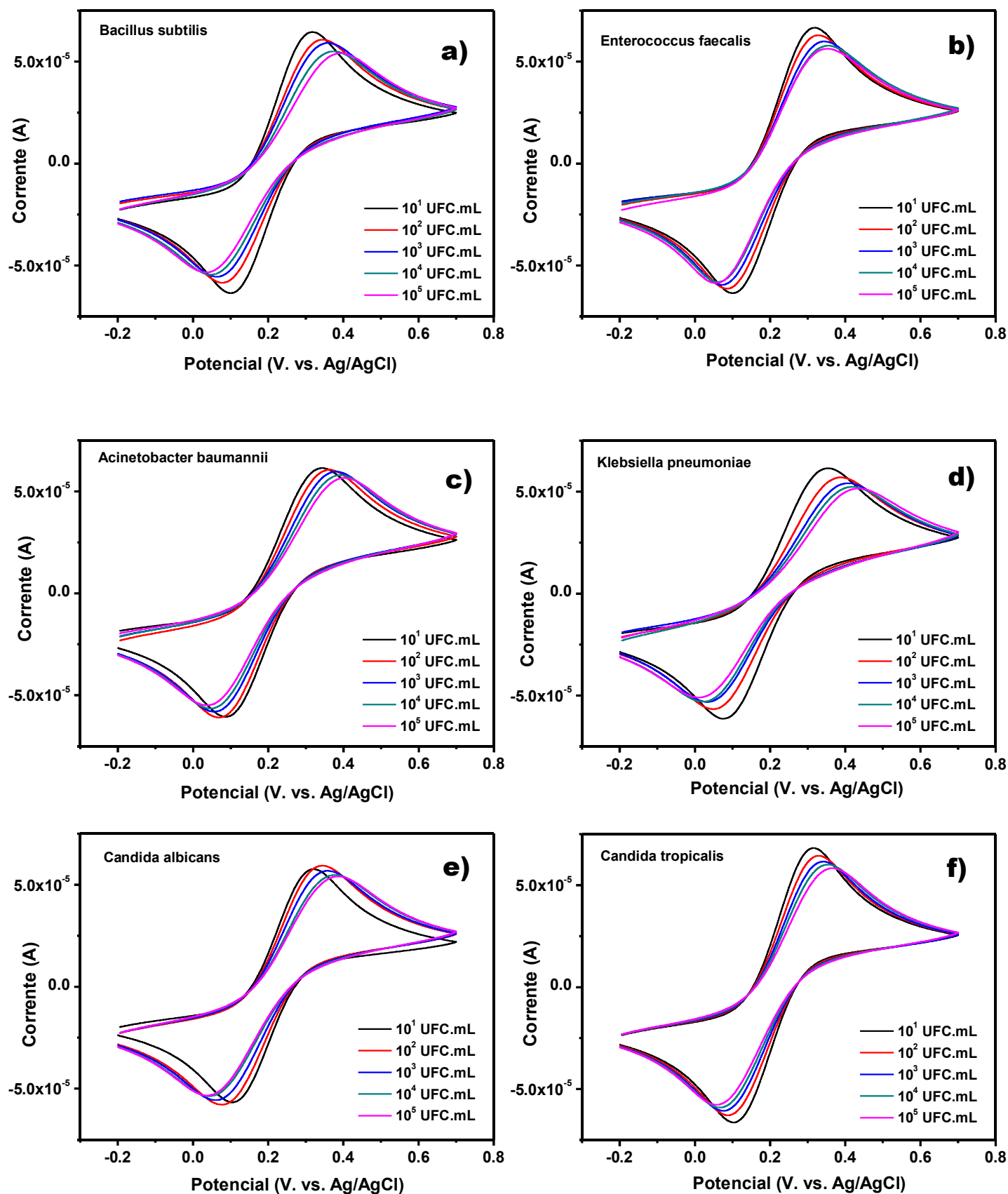


Figura 3

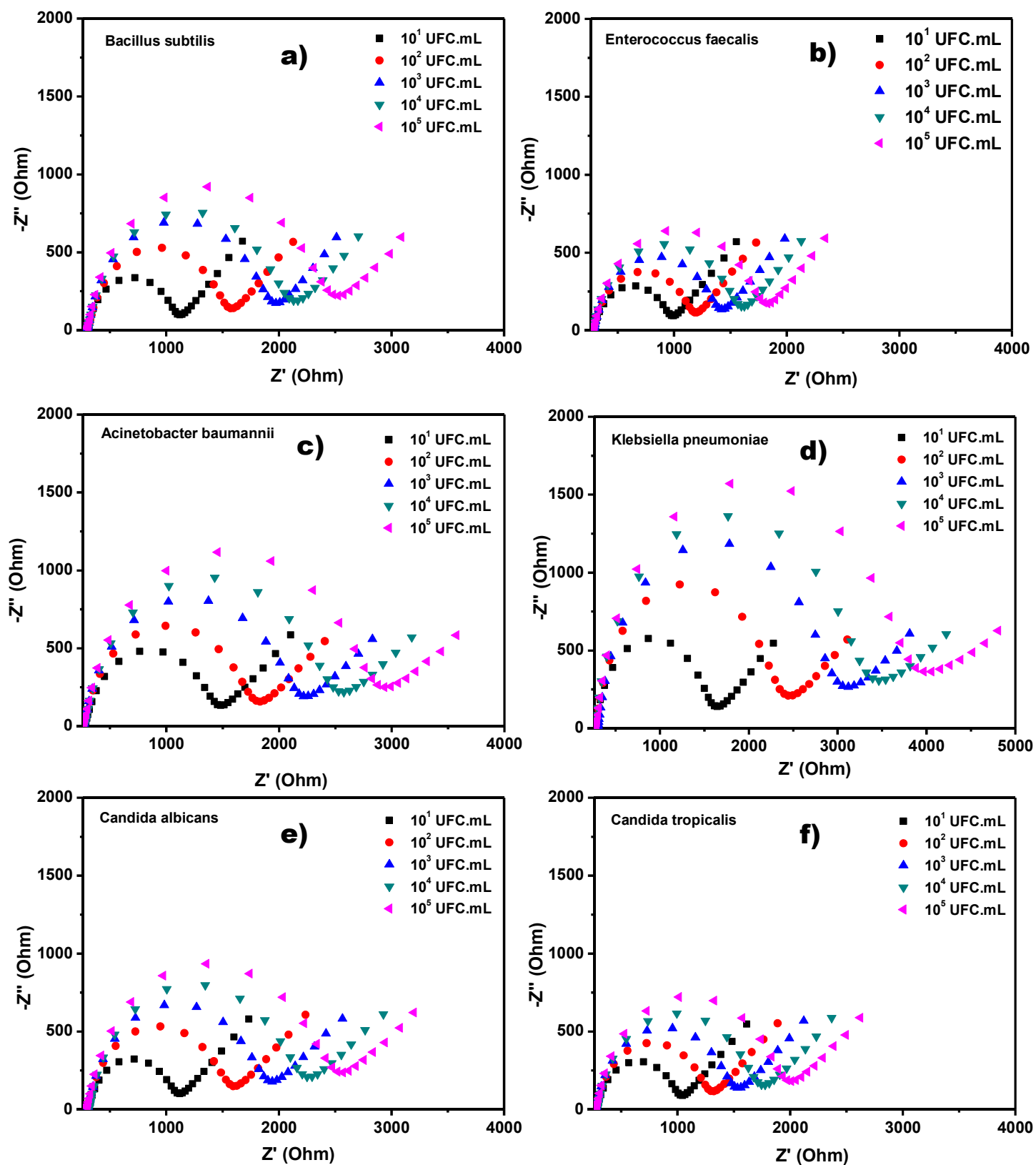


Figura 4

RESUMO

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARO E USO DO MESMO

A presente invenção refere-se a uma plataforma biossensora para análise e identificação eletroquímica de microorganismos de interesse clínico, tendo como elemento de biorreconhecimento o peptídeo antimicrobiano de nome temporina-PTA (T-PTA). As técnicas espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC) são os métodos de escolha para rápida e sensível avaliação da detecção dos analitos-alvo. Em adição, a presente invenção refere-se a um processo de montagem da plataforma biossensora, bem como o uso do mesmo. O biossensor proposto apresenta em sua composição uma monocamada automontada de composto tiolado, nanopartículas magnéticas revestidas por ouro e 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) e o peptídeo T-PTA. Em adição, a plataforma biossensora desenvolvida é capaz de detectar e diferenciar entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de detectar fungos do gênero *Candida* spp., apresentando limite de detecção de 10^1 UFC.mL⁻¹.

APÊNDICE C – PATENTE 3

**“BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO
E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS”**

18/12/2020

870200158794

15:12



29409161918340861

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 026059 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Depositante 2 de 4

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FUB

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00038174000143

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Depositante 3 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO - UCDB

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 03226149001587

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Avenida Tamandaré, nº 6000, Jardim Seminário

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79117-900

País: BRASIL

Telefone: (67) 331 23300

Fax: (67) 331 23301

Email:

Depositante 4 de 4

Nome ou Razão Social: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO CATÓLICA - UBEC

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00331801000130

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: QS 01, Rua 212, Lotes 19, 21 e 23, Sala 2.903, Ed. Connect Towers

Cidade: Taguatinga

Estado: DF

CEP: 71950-550

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS

Resumo: A invenção aqui descrita refere-se a um biossensor eletroquímico baseado em novo peptídeo antimicrobiano para a rápida e sensível detecção de microorganismos de interesse clínico. Sua composição nanoestruturada agrega monocamada automontada de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), ligadas fortemente ao ouro do eletrodo de trabalho por meio de interações sulfidríla-ouro. Nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana (Fe₃O₄@Quitosana) foram utilizadas para melhor migração da corrente elétrica e ancoragem ao peptídeo antimicrobiano synoeca-MP, elemento de biorreconhecimento para a identificação e diferenciação de bactérias e fungos presentes em amostras líquidas. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizada para análise do processo de montagem da plataforma biossensora, bem como determinar a detecção dos analitos-alvo. O sistema apresentado se destaca diante dos métodos tradicionais por dispor de análise rápida (5-10 minutos), limite de detecção de 10¹ a 10⁵ UFC.mL⁻¹ e elevado potencial de miniaturização.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR

CPF: 09575433440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Avenida Professor Artur de Sá, 1161, Várzea

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-525

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 484632

Fax:

Email: albertogaldino16@gmail.com

Inventor 2 de 8

Nome: ISAAC AARÓN MORALES FRIAS

CPF: 01821530454

Nacionalidade: Mexicana

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua José Nunes da Cunha, 378, Piedade

Cidade: Jaboatão dos Guararapes

Estado: PE

CEP: 54410-280

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 340834

Fax:

Email: iam.ibt@gmail.com

Inventor 3 de 8

Nome: MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA

CPF: 00966001443

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Estrada das Ubaias, nº 713, Apt. 302, Casa Forte

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52061-080

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 477541

Fax:

Email: m_danielly@yahoo.com.br

Inventor 4 de 8

Nome: REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

CPF: 03547189403

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Amália Bernadino de Souza, 670, apt. 1601, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51021-150

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 479644

Fax:

Email: goncalves_reginaldo@hotmail.com

Inventor 5 de 8

Nome: SANDRA REGINA DE SÁ

CPF: 08178824485

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua cento e oito, n 375, Jardim Paulista

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 53407-270

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 465133

Fax:

Email: gi_212@hotmail.com

Inventor 6 de 8

Nome: OCTÁVIO LUIZ FRANCO

CPF: 75523400378

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Tokio, 652, Vila Palmira

Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79112-180

País: BRASIL

Telefone: (67) 999 854942

Fax:

Email: ocfranco@gmail.com

Inventor 7 de 8

Nome: MÁRCIA RENATA MORTARI

CPF: 82888515172

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: SQB Bloco O, apartamento 104, Guará 1

Cidade: Brasília

Estado: DF

CEP: 71009-090

País: BRASIL

Telefone: (61) 981 147225

Fax:

Email: mmortari@unb.cbr

Inventor 8 de 8

Nome: CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE

CPF: 02431455432

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Estrada das Ubaías, nº 713, Apt. 302, Casa Forte

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52061-080

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 140044

Fax:

Email: csrandrade@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU e comprovante.pdf
Procuração	Procuração UnB.pdf
Delegação de Poderes	Delegação de Poderes UnB.pdf
Procuração	Procuração UCDB.pdf
Procuração	Procuração UCB UBEC.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Quadro Reivindicatório.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A70AB7C

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 13/04/2020

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

Klebsiella pneumoniae
Pseudomonas aeruginosa
Bacillus subtilis
Enterococcus faecalis
Candida albicans
Candida tropicalis

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS

Campo da invenção

[001] A invenção em questão trata de uma inovadora plataforma biossensora para a identificação de microrganismos patogênicos. A invenção consiste na administração de um peptídeo antimicrobiano (PAM) isolado do veneno da vespa social *Synoecca surinama*, o synoecca-MP, à superfície de nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana, um polímero natural, sendo estas imobilizadas a superfície de um substrato metálico como o ouro presente em eletrodos usados em estudos eletroquímicos. Tal invenção proposta dispõe de grande potencial de mercado e uso na vida diária para a detecção de patógenos presentes em água contaminada ou em amostras biológicas.

[002] A conexão entre biomoléculas e nanoestruturas é um recurso promissor para a expansão da área biomédica voltada a criação de biodispositivos sensores. Materiais nanoestruturados como as nanopartículas magnéticas revestidas pelo polímero quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$) características físico-químicas únicas e extremamente úteis voltadas para o auxílio no tratamento de doenças, bem como no diagnóstico, sobretudo quando associadas a biossensores. Em adição, tais nanopartículas apresentam uma resposta eletroquímica favorável a migração de elétrons, sendo facilmente administrada por meio de técnicas eletroquímicas como a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), também amplamente exploradas na avaliação de biossensores.

[003] O peptídeo do presente projeto apresenta uma estrutura de resíduos de aminoácidos inovadora (INWLKLGKKIIASL-NH₂), sendo este a primeira proposta a explorar sua atividade com objetivos diagnósticos. Sua associação a nanoestruturas ostenta múltiplas finalidades, visando o uso como agentes antimicrobianos e como elementos sensores de microrganismos, sendo esta segunda colocação explorada na presente invenção. Em adição, sua estrutura permite a integração em dispositivos sensores que podem ser facilmente miniaturizados.

Fundamentos da invenção

[004] A água, elemento indispensável à vida, encontra um problema crescente a nível mundial: a água disponível é muito salina ou considerada apta para consumo se torna inútil devido a poluição desencadeada pelos seres humanos.

[005] Em virtude do fenómeno do crescimento populacional, torna-se maior a necessidade da produção de materiais e serviços cujo uso da água se torna indispensável, aumentando seu consumo a nível doméstico e a nível industrial, percorrendo áreas como a agricultura, piscicultura, recreação aquática e a manutenção de ecossistemas.

[006] Pode-se destacar alguns tipos de patógenos como os mais presentes em casos de doenças desencadeadas por água contaminada, onde bactérias e outros microorganismos ocasionam a maioria dos casos com cerca de 57% dos agentes etiológicos encontrados, quando comparado com parasitas (19%) e vírus (7%) (SAXENA, 2020).

[007] Intoxicação alimentar é outro ponto alarmante quanto à saúde humana. A presença direta de microorganismos, bem como das toxinas produzidas por bactérias e fungos em alimentos sólidos e líquidos são responsáveis por milhões de casos de intoxicação ao redor do mundo. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que, anualmente, cerca de 600 milhões de pessoas são acometidas por doenças ou intoxicações causadas por microorganismos presentes em alimentos contaminados (ASIA, 2016).

[008] Bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos também estão presentes em infecções nosocomiais. Tais microorganismos permanecem um problema de saúde pública devido ao persistente obstáculo da resistência a antimicrobianos. Dentre as Gram-positivas, pode-se destacar a patogenicidade do *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, sendo responsáveis principalmente por infecções pulmonares, infecções das valvas cardíacas e da corrente sanguínea (BEREKET et al., 2012; CALFEE et al., 2014; PUCHTER et al., 2018).

[009] As bactérias Gram-negativas são as responsáveis pelos casos mais graves de infecções no ambiente hospitalar, onde microorganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Acinetobacter baumannii* se destacam por colonizarem áreas onde ocorrem a inserção de cateteres e cânulas, além de estarem presentes em infecções no sítio cirúrgico (MACVANE, 2016; MEHRAD et al., 2015; PEREZ et al., 2010).

[0010] O diagnóstico rápido e efetivo desses microorganismos se torna crucial visando a administração imediata e efetiva do recurso terapêutico mais adequado, resultando na menor permanência no ambiente hospitalar. Tais ações reduzem os riscos de contaminação por outros patógenos, bem como a redução dos gastos públicos e próprios para o tratamento.

[0011] O diagnóstico presuntivo de bactérias e fungos tem como método principal os meios de cultura sólidos e semissólidos. Apesar de indicar o crescimento microbiano, esses meios de cultura trazem um diagnóstico parcial para determinado microorganismo específico, uma vez que muitos meios de cultura são específicos para apenas uma espécie, seja ela bacteriana ou fúngica. Em adição, um amplo período de tempo é necessário para se obter o crescimento do microorganismo, levando de 24 a 72h após o semeio (LÓPEZ et al., 2009).

[0012] Se tratando de métodos imunoenzimáticos, destacam-se os ensaios por imunoabsorção enzimática como o teste ELISA, o qual apesar de efetivos, resultados falso-positivos são frequentes (TERATO et al., 2014). Os testes moleculares se destacam devido a sua especificidade, porém, o elevado custo de equipamentos e reagentes, bem como o tratamento dispendioso da amostra para que ocorra a reação de forma adequada, limitam seu uso principalmente no ambiente hospitalar (GADSBY et al., 2015; SINGH et al., 2006).

[0013] Se destacando como alternativa inovadora para detecção e diferenciação de microorganismos, os biossensores eletroquímicos tem ganhado espaço no ambiente acadêmico e hospitalar. O primeiro protótipo desenvolvido por Clark e Lyons, um biossensor enzimático para detecção de glicose, fomentou a possibilidade de detecção de diferentes analitos (PUNIA; SINGH, 2017).

[0014] Um biossensor é composto basicamente por: 1) um elemento sensor biológico ativo (podendo ser, por exemplo, uma enzima, anticorpo, fragmento de DNA ou RNA, peptídeos, etc.) exercendo a função de identificar um analito-alvo e 2) um transdutor físico-químico com função de converter a interação analito-elemento sensor em um sinal elétrico mensurável, sendo este proporcional a concentração do analito presente na amostra (ENSAFI, 2019; GRIESHABER et al., 2008).

[0015] Uma ampla variedade de transdutores podem ser utilizados no desenvolvimento de biossensores, onde se destacam os ópticos (absorbância, luminescência, etc.), acústicos (piezoelétrico), termométricos e eletroquímicos (PUNIA; SINGH, 2017). Dentre os citados, os biossensores eletroquímicos são os mais explorados por permitirem a elaboração de dispositivos miniaturizados, portáteis e de baixo custo, associando tais características a rápida e sensível detecção de múltiplos analitos (HAMMOND et al., 2016; MADURAVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018).

[0016] Inicialmente explorado como alternativa contra o crescente problema da resistência a antibióticos, os peptídeos antimicrobianos (PAM) dispuseram de inovadoras aplicações, sendo uma delas a área diagnóstica. Tais peptídeos assumem uma conformação anfipática útil na interação com membranas celulares, como as dos microorganismos (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). Em adição, é importante ressaltar que os PAM dispõem de elevada seletividade para células microbianas, demonstrando baixa toxicidade a células de mamíferos (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010). Esta característica torna esses peptídeos úteis em testes de detecção de microorganismos em amostras sanguíneas, como observado em casos de bacteremia.

[0017] Podendo ser isolado de vários organismos de diferentes origens (mamíferos, peixes, insetos, plantas, microorganismos, etc.), os PAM apresentam uma estrutura de 10-50 aminoácidos (HANCOCK; SAHL, 2006). O PAM da presente proposta, o synoeca-MP, é isolado do veneno da vespa social *Synoeca surinama*, contendo 14 aminoácidos em sua estrutura (INWLKLGKKIIASL-NH₂). Estudos iniciais com o synoeca-MP evidenciaram a efetividade do peptídeo contra diferentes cepas de microorganismos, como *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (DANTAS et al., 2019).

Estado da técnica

[0018] Visando a elaboração de metodologias efetivas na detecção de microrganismos, alguns estudos foram realizados. A patente US8652311B1 se refere a uma técnica de imunoensaio com medidas amperométricas para detecção de microrganismos. Na referida invenção, uma membrana condutora é utilizada em um eletrodo de carbono. Os testes tiveram foco nas bactérias *Escherichia coli* O157R7 e *Staphylococcus* sp., além de Hantavírus.

[0019] Outro estudo eletroquímico para detecção de microrganismos se refere ao descrito na patente US7763426B2. O alvo principal se trata da bactéria Gram-negativa *E. coli*, fazendo uso de um oligonucleotídeo (rRNA 16S bacteriano) que leva a hibridização da sequência do ácido nucleico alvo a ser detectado.

[0020] A patente WO2013034688A1 se trata de um biossensor com superfície modificada para a detecção de múltiplos alvos, utilizando da técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). O biossensor aqui desenvolvido é composto por múltiplas camadas, sendo a primeira de uma camada não-condutora, a segunda um polímero condutor como a polianilina, poli 3,4-etilenodioxitiofeno e polipirrol, dentre outros. Aqui apesar de citar uso na detecção de microrganismos, não destaca algum em específico.

[0021] Ademais, pode-se citar a patente WO2016038351, que destaca um biossensor para detecção de bactérias resistentes a antimicrobianos fazendo uso de uma sonda de DNA específica, o DNA plasmidial *bla*NDM. Tal gene codifica o “New Dheli metalo-beta-lactamase” e suas variantes. O estudo indica que tal gene é presente na *E. coli*, *Klebsiella* sp. e em microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, sendo, portanto, seus principais alvos de detecção. Em adição, a técnica impedimétrica foi a de escolha para avaliar o biorreconhecimento.

[0022] Outro estudo envolvendo biossensores bacterianos foi desenvolvido na patente WO2005067425A2, se tratando de um biossensor potenciométrico para detecção de esporos bacterianos. O eletrodo de trabalho escolhido foi o de óxido de índio e estanho (ITO). O biossensor teve como elemento sensor peptídeos específicos para interagirem com esporos de *Bacillus subtilis* e *Bacillus anthracis* Sterne, sendo, portanto, seus alvos

de detecção. Os peptídeos foram imobilizados ao eletrodo de trabalho pela técnica da imobilização de monocamada de polisiloxilano.

[0023] Além do supracitado, as patentes US20050059105A1 e BR1020190124539 descrevem um método e dispositivo biossensor impedimétrico para detecção de microorganismos em solução. O primeiro estudo foi realizado em eletrodos interdigitados, enquanto que o segundo foi conduzido em eletrodo com superfície de ouro, ambos utilizando as mudanças na impedância do sistema para avaliar a detecção do sensor. O elemento sensor de escolha do primeiro foram anticorpos, sem especificar o tipo e qual microorganismo alvo, enquanto que do segundo estudo citado teve uso o peptídeo Clavanina A. A patente envolvendo o uso de anticorpos não explorou o uso de nanopartículas, enquanto que o trabalho com peptídeo envolveu o uso de nanopartículas magnéticas, sendo as mesmas revestidas com ouro e o aminoácido cisteína.

[0024] Verifica-se, portanto, que a presente invenção se diferencia das anteriormente citadas pelo fato de ser a única que une uma estrutura de MBA podendo ser montada em superfície metálica como ouro ou superfícies como a de eletrodo de carbono vítreo, nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana, tendo como elemento sensor biológico ativo o novo peptídeo antimicrobiano synoeca-MP para identificação de múltiplos alvos, destacando as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, além dos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

Breve descrição dos desenhos

[0025] A Figura 1 apresenta um esquema do método de construção da plataforma biossensora.

[0026] A Figura 2 apresenta a caracterização eletroquímica do processo de montagem do biossensor no eletrodo de trabalho, sendo conduzido uma análise voltamétrica (a) e impedimétrica (b).

[0027] A Figura 3 representa graficamente os espectros de impedância do biossensor eletroquímico frente às espécies de microorganismos em diferentes concentrações, em que (A) refere-se a *Klebsiella pneumoniae*, (B) *Pseudomonas aeruginosa*, (C) *Bacillus subtilis*, (D) *Enterococcus faecalis*, (E) *Candida albicans* e (F) *Candida tropicalis*.

Descrição da invenção

[0028] De início, houve a síntese das nanopartículas magnéticas, seguindo com o revestimento pela quitosana, polímero natural que favoreceu a presença de grupamentos amina livres em sua superfície.

[0029] A síntese das nanopartículas revestidas por quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$) foi realizada pelo método da co-precipitação. Sais de ferro foram utilizados, mais precisamente o cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em concentrações específicas. O peptídeo synoeca-MP foi ancorado à superfície das nanopartículas a partir da ligação favorecida pelo glutaraldeído, unindo o grupamento amina livre da quitosana que reveste a nanopartícula magnética e o grupo amina da extremidade N-terminal do peptídeo.

[0030] Adicionalmente, o peptídeo antimicrobiano synoeca-MP é o elemento chave da presente invenção, uma vez que tal peptídeo agirá diretamente na detecção e diferenciação dos microorganismos de interesse clínico, sendo este o primeiro protótipo a utilizar do synoeca-MP para uso na área de diagnósticos.

[0031] Em adição, a invenção proposta refere-se a um biossensor eletroquímico com avaliação a partir da técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para a detecção de múltiplos microorganismos, com foco em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Este biossensor compreende o uso de três eletrodos independentes entre si: eletrodo auxiliar, eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, sendo este último o local de montagem da plataforma sensora nanoestruturada, conforme processo descrito na presente redação.

Exemplos de concretizações da invenção

[0032] A invenção aqui descrita propõe a montagem e uso de um novo sistema biossensor para detecção de microorganismos, apresentando fácil síntese e manuseio. Os elementos que compõem a plataforma sensora conferem notável sensibilidade na detecção do analito-alvo, destacando sua efetividade quando comparado com os métodos tradicionais de detecção e identificação microbiana.

[0033] A síntese das nanoestruturas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ foi realizada pelo método da co-precipitação. Em um béquer, 50-100 mL de água deionizada obtida por um sistema Milli-Q é misturada, sob o auxílio de agitador magnético, a cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) na concentração variável de 0,05 a 0,2 M e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 0,01 a 0,1 M. Após 10-30 min de agitação, uma solução de quitosana é adicionada à suspensão, sendo subsequentemente submetida a aquecimento sob agitação magnética. As etapas subsequentes são caracterizadas pela adição de hidróxido de amônia 20% (NH_4OH), resultando na mudança da cor da solução de marrom-escuro para preta. Tal particularidade é indicativo da obtenção das nanopartículas magnéticas, a magnetita (Fe_3O_4). As mesmas foram lavadas com auxílio de campo magnético em água e etanol 90%, até a suspensão com nanopartículas atingir pH 7. O recobrimento por quitosana é percebido imediatamente após as inúmeras lavagens em água e etanol, pois se o polímero não estiver presente revestindo a nanopartícula, a solução adquire uma coloração amarronzada. Essa coloração é indicativa de oxidação das nanopartículas, o qual com a cobertura da quitosana, a oxidação é limitada, resultando em uma solução límpida após a “pesca” das nanoestruturas.

[0034] O recobrimento da nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ com o peptídeo synoeca-MP foi realizado utilizando glutaraldeído, preferencialmente 10%. Cerca de 100 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ são colocadas em um béquer contendo 50-100 mL de glutaraldeído. Para dispersão das nanopartículas, o béquer é mergulhado em banho ultrassônico durante 1-3h, preferencialmente 2h. Em seguida, submetida a agitação magnética por 6h. Após o período determinado, as nanopartículas são lavadas três vezes com água deionizada para remoção do glutaraldeído não ligado às $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$. Em seguida, o peptídeo synoeca-MP é diluído na concentração de 0,5-2 mg por mL de água deionizada, preferencialmente 1mg/mL. As nanopartículas funcionalizadas pelo glutaraldeído são

adicionadas à suspensão peptídica. Posteriormente, a suspensão peptídeo-nanopartículas são submetidas a banho ultrassônico por 2h, e em seguida homogeneizadas sob agitação magnética durante 24h. Por fim, as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana-SYNOECA}$ são lavadas com água deionizada para remoção do synoeca-MP livre na solução e ressuspensas em 5mL de tampão fosfato com pH preferencialmente 7.

[0035] Para a obtenção da plataforma sensora nanoestruturada, inicialmente o eletrodo de trabalho com superfície metálica, preferencialmente ouro, é limpa em banho de NaClO por um período de tempo que varia de 5 a 20 minutos. Em seguida, o eletrodo é lavado com água deionizada e posteriormente submetida a banho ultrassônico durante 5 a 20 minutos, preferencialmente durante 5 minutos.

[0036] Subsequentemente, o eletrodo de trabalho devidamente limpo é imerso em uma solução de MBA na concentração que variável de 30 a 70 mM, preferencialmente 50 mM. O solvente utilizado pode ser etanol, metanol e isopropanol, preferencialmente etanol. O período de incubação varia de 5 a 30 minutos. A utilização do MBA dará origem a uma camada nanoestruturada no ouro do eletrodo devido a presença do grupamento tiol ($-\text{SH}$). Em adição, o MBA fornecerá grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) livres, essenciais para a ancoragem dos demais elementos da plataforma sensora.

[0037] Posteriormente, o COOH é ativado pelos agentes acopladores EDC NHS (na concentração variável de 0,1 a 0,5 M para ambos), favorecendo uma ligação estável do mesmo aos grupamentos amina livres presentes na superfície das nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana-SYNOECA}$, sendo depositada por um período de tempo que varia de 5 a 20 minutos.

[0038] Após cada deposição dos componentes da plataforma, o eletrodo de trabalho é cuidadosamente lavado com água deionizada para remoção de compostos não ligados ao eletrodo.

[0039] Após obtenção da plataforma, temos início os testes com os microorganismos de interesse clínico, a saber: *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativas), *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* (Gram-positivas), além dos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. As bactérias e fungos são semeados em meio de

cultura ágar Mueller Hinton e Sabouraud, respectivamente, durante 24 h a 37°C em estufa própria para crescimento microbiano. Após crescimento, as colônias mais isoladas são coletadas e inseridas em solução salina 0,9% esterilizada, e de lá separadas em diferentes concentrações de acordo com a escala de MacFarland, variando de 10^1 a 10^5 unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹). Tal procedimento é realizado com o auxílio de espectrofotômetro na região UV-Vis. Diferentes solventes, bem como amostras biológicas podem ser utilizadas na separação das concentrações de microorganismos, como água, tampão fosfato, solução salina, suor, sangue e urina preferencialmente tampão fosfato.

[0040] Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em temperatura ambiente ($24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), no interior de uma gaiola de Faraday para maior estabilidade das análises voltamétricas e impedimétricas.

[0041] Para analisar a detecção dos microorganismos, inicialmente o eletrodo de trabalho contendo a plataforma biossensora pode ser inserido na suspensão contendo determinado microorganismo ou 2 µL da suspensão pode ser diretamente aplicado ao eletrodo. O período de interação biossensor-microorganismo varia de 2 a 10 minutos, preferencialmente 5 minutos.

[0042] As análises são realizadas em solução de ferro-ferricianeto de potássio na concentração 1:1 variável de 1 a 50 mM, preferencialmente 10 mM, preparadas em tampão fosfato pH 7.

[0043] Técnicas eletroquímicas como a VC e EIS são extremamente úteis no estudo de biossensores por avaliar as mudanças na dupla camada elétrica que existe entre a solução eletrolítica/sonda redox e a superfície do eletrodo. As medidas de voltametria cíclica são realizadas preferencialmente no potencial entre -0,2 a 0,7 com velocidade de varredura de 50 a 100 mV.s⁻¹. Para as medidas da espectroscopia de impedância eletroquímica, utiliza-se preferencialmente a frequência de 100 mHz a 100 kHz com amplitude e onda senoidal de 1-100 mV. Um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N (Ecochemie, Holanda) foi utilizado para a realização das análises.

[0044] Os resultados voltamétricos e impedimétricos da montagem do sensor indicam a efetiva deposição de cada componente, apresentando o fechamento dos picos catódicos

e anódicos (com exceção da aplicação do EDC NHS + Fe₃O₄@Quit devido a seu caráter condutor, facilitando a passagem da corrente elétrica) e consequente aumento do semicírculo de Cole-Cole.

[0045] Em adição, os resultados eletroquímicos que se referem a identificação dos microorganismos, indicaram efetiva detecção e diferenciação das espécies de Gram-positivas e Gram-negativas e das espécies de *Candida* sp.

[0046] O circuito equivalente de Randles avalia os dados experimentais da impedância. Tal circuito é composto pela resistência da solução eletrolítica (R_Ω), elemento de fase constante (Q), impedância de Warburg (Z_w) e a resistência a transferência de carga (R_{CT}). Os valores do R_{CT} são os mais utilizados na avaliação de biossensores eletroquímicos por ser obtido a partir da variação do semicírculo de Cole-Cole, sendo este diretamente proporcional à concentração do composto adicionado. Por exemplo, os componentes da plataforma biossensora MBA ($R_{CT} = 0,460 \text{ k}\Omega$) e Fe₃O₄@Quitosana-SYNOECA ($R_{CT} = 0,265 \text{ k}\Omega$), indicados na Tabela 1 e os microorganismos avaliados, demonstrado na Tabela 2, apontando diferentes valores de R_{CT} diretamente proporcionais às concentrações das suspensões microbianas, diferindo entre as espécies devido às características próprias da parede celular de cada microorganismo.

[0047] TABELA 1.

PLATAFORMA SENSORA	R_{CT} (k Ω)	Q (μ F)	n	R_Ω	W
Eletrodo Limpo	0,082	2,080	0,862	0,323	0,987
MBA	0,460	1,810	0,860	0,320	0,986
Fe ₃ O ₄ @Quitosana-SYNOECA	0,265	1,850	0,828	0,312	0,974

[0048] Assim sendo, a Tabela 2 exibe os valores do circuito de Randles apresentados por cada microorganismo, onde pode-se observar o aumento consecutivo dos valores de R_{CT} à medida que a concentração dos analitos-alvo aumenta, sendo estes de 10^1 a 10^5 UFC.mL⁻¹.

[0049] Os resultados obtidos destacam a capacidade de detecção e diferenciação dos microorganismos conferida pela plataforma biossensora proposta, sendo esta a primeira da literatura a oferecer um sistema sensor baseado no peptídeo antimicrobiano synoeca-MP para detecção de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos em amostras

líquidas. Os microorganismos (de elevada eletronegatividade) são inicialmente atraídos eletricamente à estrutura catiônica do synoeca-MP, sendo que este, logo em seguida, se insere à parede celular microbiana. Desta forma, devido às características estruturais de cada microorganismo, uma resposta elétrica específica é obtida.

[0050] TABELA 2.

Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R _{ct} (kΩ)	Q (μF)	n	R _Ω	W
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
10 ¹	1,17	0,963	0,880	0,306	0,898
10 ²	1,87	0,861	0,891	0,308	0,860
10 ³	2,53	0,827	0,895	0,314	0,807
10 ⁴	3,15	0,818	0,895	0,325	0,746
10 ⁵	3,79	0,817	0,895	0,311	0,705
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
10 ¹	1,28	1,410	0,848	0,343	0,838
10 ²	1,82	1,210	0,861	0,344	0,839
10 ³	2,20	1,060	0,879	0,334	0,844
10 ⁴	2,52	1,020	0,883	0,344	0,831
10 ⁵	3,06	1,030	0,878	0,357	0,769
<i>Candida albicans</i>					
10 ¹	1,14	1,100	0,870	0,318	0,870
10 ²	1,61	0,949	0,884	0,313	0,854
10 ³	2,04	0,875	0,891	0,324	0,834
10 ⁴	2,42	0,839	0,895	0,318	0,811
10 ⁵	2,91	0,793	0,892	0,330	0,717
<i>Candida tropicalis</i>					
10 ¹	1,04	1,480	0,850	0,312	0,893
10 ²	1,40	1,240	0,863	0,310	0,883
10 ³	1,81	1,120	0,867	0,310	0,824
10 ⁴	2,18	1,070	0,864	0,321	0,767
10 ⁵	2,71	0,989	0,876	0,316	0,752
<i>Bacillus subtilis</i>					
10 ¹	0,75	1,490	0,835	0,319	0,845
10 ²	1,43	0,987	0,876	0,328	0,813
10 ³	1,88	0,862	0,889	0,326	0,803
10 ⁴	2,21	0,806	0,895	0,326	0,794
10 ⁵	2,68	0,767	0,900	0,334	0,776
<i>Enterococcus faecalis</i>					
10 ¹	0,412	1,393	0,832	0,335	0,933
10 ²	0,726	1,290	0,855	0,329	0,915
10 ³	0,983	1,170	0,868	0,314	0,941
10 ⁴	1,31	1,080	0,871	0,329	0,884
10 ⁵	1,44	1,030	0,879	0,324	0,920

[0051] Referências

[0052] ASIA, S. WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths. **Saudi Medical Journal**, v. 37, n. 1, p. 108–109, 2016.

[0053]BEREKET, W. et al. Update on bacterial nosocomial infections. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 8, p. 1039–1044, 2012.

[0054]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.

[0055]DANTAS, E. M. G. L. et al. Synergistic activity of chlorhexidine and synoeca-MP peptide against *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 9, p. 16068–16079, 2019.

[0056]ENSAFI, A. A. An introduction to sensors and biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 1–10.

[0057]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.

[0058]GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Journal Of Applied Biomedicine**, n. January, p. 57–64, 2008.

[0059]HAMMOND, J. L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 69–80, 2016.

[0060]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.

[0061]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.

[0062]MACVANE, S. H. Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: A Focus on Gram-Negative Bacterial Infections. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 1, p. 25–37, 2016.

[0063]MADURAIVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, n. December 2017, p. 113–129, 2018.

[0064]MEHRAD, B. et al. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. **Chest**, v. 147, n. 5, p. 1413–1421, 2015.

[0065]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.

[0066]PEREZ, F. et al. Carbapenem-resistant acinetobacter baumannii and klebsiella pneumoniae across a hospital system: Impact of post-acute care facilities on dissemination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1807–1818, 2010.

[0067]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.

[0068]PUCHTER, L. et al. Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2018.

[0069]PUNIA, T.; SINGH, A. Biosensors: its types , applications and recent technologies. **International Journal of Academic Research and Development**, v. 2, n. 5, p. 837–840, 2017.

[0070]SAXENA, S. K. **Water-Associated Infectious Diseases**. 1. ed. [s.l.] Springer Nature Singapore, 2020.

[0071]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.

[0072]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.

REIVINDICAÇÕES

1. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, caracterizado por ter a análise eletroquímica compreendendo 3 eletrodos, a saber:

- a) eletrodo de trabalho, substrato metálico preferencialmente ouro em forma de disco ou interdigitado, cuja superfície é funcionalizada por compostos que possuam em sua estrutura um grupamento tiol (-SH), preferencialmente ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), nanopartículas metálicas, preferivelmente magnéticas e revestidas pelo polímero natural quitosana e peptídeo antimicrobiano, podendo ser de qualquer tipo ou origem (natural ou sintética);
- b) eletrodo de referência, podendo ser de calomelano saturado ou de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) saturado em KCl 3 M, preferencialmente Ag/AgCl;
- c) eletrodo auxiliar, podendo ser um fio de platina ou carbono e grafite, preferencialmente platina.

2. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir como elemento de biorreconhecimento peptídeo antimicrobiano, preferencialmente o synoeca-MP (INWLKLGKKIIASL-NH₂) podendo ser utilizado de origem natural (isolado a partir da peçonha da vespa social *Synoeca surinama*) ou obtido de forma sintética a partir da sequência de aminoácidos.

3. PEPTÍDEO NATURAL OU MODIFICADO DE PEÇONHA, caracterizado por compreender qualquer uma das seguintes sequências:

Xaa1-N-W-Xaa2-K-Xaa3-G-K-K-Xaa4-Xaa5-A-Xaa6-Xaa7-NH₂ (SEQ ID NO: 1),

Xaa1-N-W-Xaa2-K-Xaa3-G-K-K-Xaa4-Xaa5-A-Xaa6-Xaa7-OH (SEQ ID NO: 2) e

Xaa1-N-W-Xaa2-K-Xaa3-G-K-K-Xaa4-Xaa5-A-Xaa6-Xaa7-R1-R2-R3-NH₂ (SEQ ID NO: 3)

Onde:

Xaa1 é representado por Isoleucina, Leucina ou Valina;

Xaa2 é uma Isoleucina, Leucina ou Valina;

Xaa3 é uma Isoleucina, Leucina ou Valina;

Xaa4 é uma Isoleucina, Leucina ou Valina;

Xaa5 é uma Isoleucina, Leucina ou Valina;

Xaa6 é uma Serina ou Treonina;

R1 é representado por Lisina ou Arginina;

R2 é representado por Leucina, Isoleucina ou Valina;

R3 é representado por Leucina, Isoleucina ou Valina.

4. PEPTÍDEO NATURAL OU MODIFICADO DE PEÇONHA, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado por as sequências compreenderem entre dez e dezessete resíduos de aminoácidos, sendo preferencialmente quatorze.
5. PEPTÍDEO NATURAL OU MODIFICADO DE PEÇONHA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por as SEQ ID NO: 1 e SEQ 2/3 ID NO: 1 e 3 poderem compreender uma amidação (NH₂) em sua porção carboxi-terminal.
6. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a avaliação eletroquímica realizada por um potenciostato/galvanostato, tendo como métodos de análise a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).
7. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO, de acordo com as reivindicações 1 e 3, caracterizado por ter as medidas eletroquímicas a partir da prévia imersão dos eletrodos em uma solução com função de sonda redox, podendo ser água, tampão fosfato ou solução de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) e ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]), preferencialmente [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ (1:1) preparada em PBS pH 7 e em temperaturas entre 20°C e 30°C, preferencialmente 25°C.
8. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO, conforme reivindicação 1, caracterizado por detectar e diferenciar microorganismos de interesse clínico presentes em amostras líquidas, como água, alimentos líquidos e bebidas, suor, sangue e urina, dentre outros fluidos corporais.

9. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO, conforme reivindicações 1 e 3, caracterizado por ter limite de detecção de entre 10^1 a 10^5 unidades formadoras de colônia por mL de solução (UFC.mL⁻¹).

10. PROCESSO PARA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado por compreender:

- a) cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 0,05 a 0,2 M, preferencialmente 0,1 M e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 0,01 a 0,1 M, preferencialmente 0,05 M, utilizando como método de síntese, preferencialmente, a técnica da co-precipitação;
- b) revestimento por polímeros naturais ou sintéticos, preferencialmente quitosana, utilizando como ligante o glutaraldeído 10%;
- c) revestimento final com o peptídeo synoeca-MP, se unindo às nanopartículas por meio do glutaraldeído;
- d) método de funcionalização compreendendo banho ultrassônico de 1h a 6h em cada etapa, preferencialmente 6h e agitação magnética vigorosa durante 24h.

11. PROCESSO PARA MONTAGEM DO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO, conforme definido na reivindicação 1, caracterizado por possuir as seguintes etapas:

- a) lavar os eletrodos em água deionizada e o eletrodo de trabalho em NaClO seguido de banho ultrassônico durante 3 minutos;
- b) formação de monocamada automontada de composto contendo grupo tiol e grupamento carboxílico livre, preferencialmente MBA, na superfície do substrato do eletrodo de trabalho, imergindo o eletrodo de 5 a 20 minutos, preferencialmente 10 minutos;
- c) utilizar os agentes acopladores 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) na concentração de 0,1 a 1 M (1:1), preferencialmente 0,4 M e 0,1 M, respectivamente, durante 1 a 30 minutos, preferencialmente 5 minutos, para ativação do grupo carboxílico livre do MBA;

d) ligação das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quitosana-SYNOECA}$ ao eletrodo de trabalho contendo o MBA ativado pelo EDC e NHS durante o tempo de 5 a 30 minutos, preferencialmente 10 minutos.

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que na análise voltamétrica do processo de montagem do biossensor, após a adição de cada componente, são realizados 1 a 5 ciclos, preferencialmente 3, de -0,2 a 0,7 V com velocidade de varredura de 10 a 100 mV.s^{-1} , preferencialmente 50 mV
13. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a análise impedimétrica tanto do procedimento de montagem do biossensor, bem como da detecção dos microorganismos
14. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que após a ligação de cada componente da plataforma biossensora, o eletrodo de trabalho deve ser lavado em água deionizada ou tampão fosfato pH 7 para remoção de compostos não aderidos.
15. USO DO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO, conforme definido nas reivindicações 1 e 5, caracterizado por ser direcionado a detecção de microorganismos como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, protozoários e vírus, preferencialmente bactérias e fungos.

DESENHOS

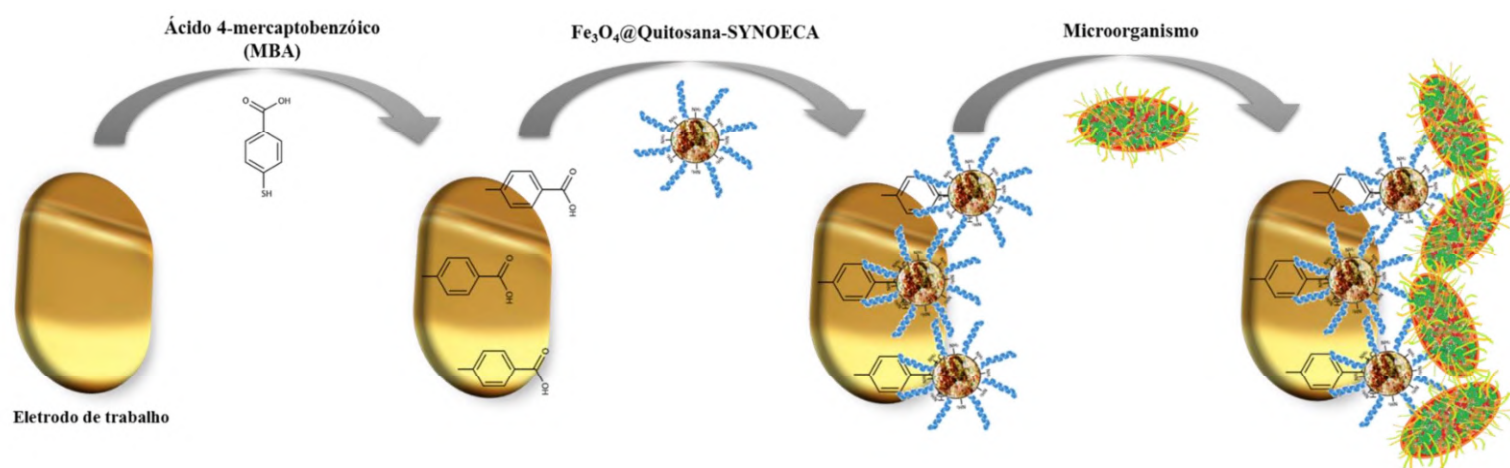


Figura 1

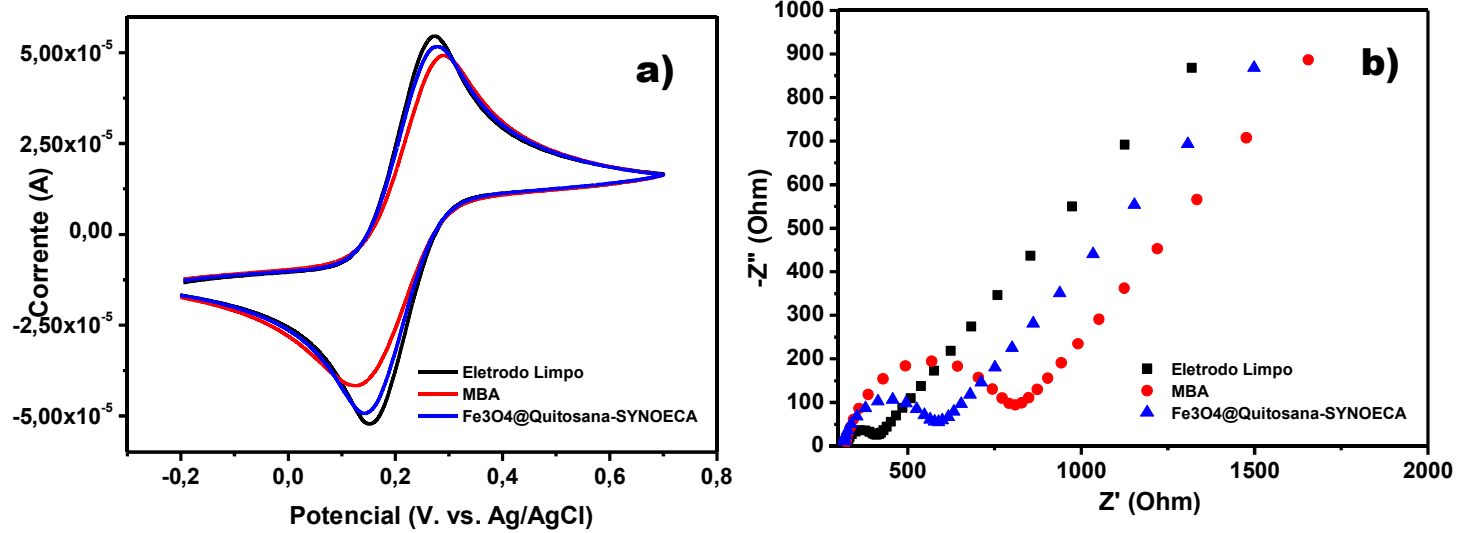


Figura 2

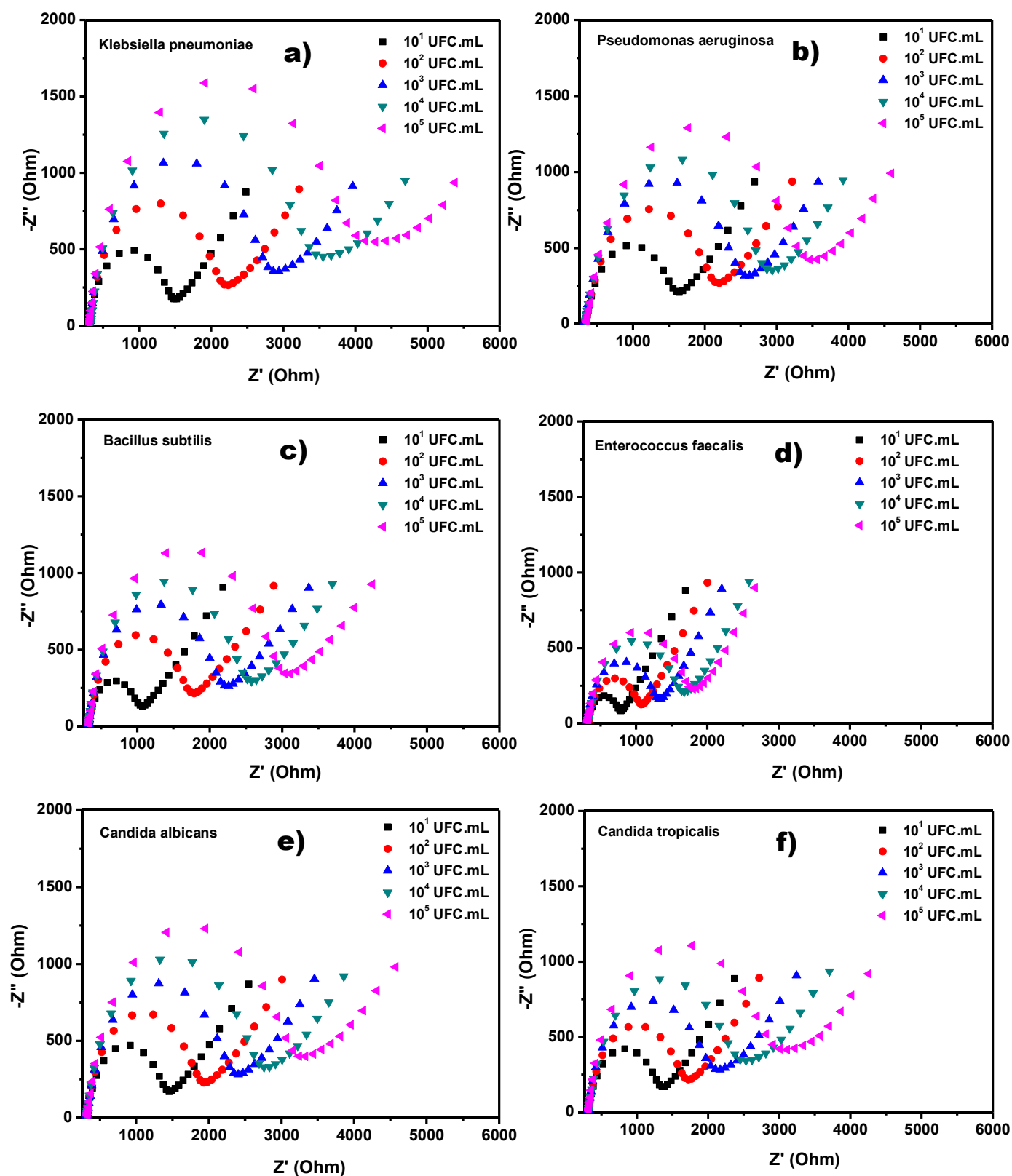


Figura 3

RESUMO

BIOSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS

A invenção aqui descrita refere-se a um biossensor eletroquímico baseado em novo peptídeo antimicrobiano para a rápida e sensível detecção de microorganismos de interesse clínico. Sua composição nanoestruturada agrega monocamada automontada de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), ligadas fortemente ao ouro do eletrodo de trabalho por meio de interações sulfidríla-ouro. Nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Quitosana) foram utilizadas para melhor migração da corrente elétrica e ancoragem ao peptídeo antimicrobiano synoeca-MP, elemento de biorreconhecimento para a identificação e diferenciação de bactérias e fungos presentes em amostras líquidas. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizada para análise do processo de montagem da plataforma biossensora, bem como determinar a detecção dos analitos-alvo. O sistema apresentado se destaca diante dos métodos tradicionais por dispor de análise rápida (5-10 minutos), limite de detecção de 10^1 a 10^5 UFC.mL⁻¹ e elevado potencial de miniaturização.

APÊNDICE D – ARTIGO 1

**“CONCANAVALIN A DIFFERENTIATES GRAM POSITIVE BACTERIA THROUGH
HIERARCHIZED NANOSTRUCTURED TRANSDUCER”**



Contents lists available at ScienceDirect

Microbiological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micres

Concanavalin A differentiates gram-positive bacteria through hierarchized nanostructured transducer

Alberto G. da Silva Junior^{a,b}, Isaac A.M. Frias^{a,b}, Reginaldo G. Lima-Neto^c, Sandra R. Sá^b, Maria D.L. Oliveira^{a,b}, César A.S. Andrade^{a,b,*}

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

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Biosensor

Nanostructured transducers

Bacteria

Concanavalin A

Electrochemical impedance spectroscopy

ABSTRACT

Biosensors are pre-prepared diagnostic devices composed of at least one biological probe. These devices are envisaged for the practical identification of specific targets of microbiological interest. In recent years, the use of narrow-specific probes such as lectins has been proven to distinguish bacteria and glycoproteins based on their superficial glycomic pattern. For instance, Concanavalin A is a carbohydrate-binding lectin indicated as a narrow-specific biological probe for Gram-negative bacteria. As a drawback, Gram-positive bacteria are frequently overlooked from lectin-based biosensing studies because their identification results in low resolution and overlapped signals. In this work, the authors explore the effect that platform nanostructuring has over the electrochemical response of ConA-based platforms constructed for bacterial detection; one is formed of chitosan-capped magnetic nanoparticles, and another is composed of gold nanoparticle-decorated magnetic nanoparticles. The biosensing platforms were characterized by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) as a function of bacterial concentration. Our results show that probe-target interaction causes variations in the electrical responses of nanostructured transducers. Moreover, the association of gold nanoparticles to magnetic nanoparticles resulted in an electrical enhancement capable of overcoming low resolution and overlapping Gram-positive identification. Both platforms attained a limit of detection of 10^{-4} CFU mL⁻¹, which is useful for water analyses and sanitation concerns, where low CFU mL⁻¹ are always expected. Although both platforms were able to detect Gram-negative bacteria, Gram-positives were only correctly differentiated by the gold nanoparticle-decorated magnetic nanoparticles, thus demonstrating the positive influence of hierarchically nanostructured platforms.

1. Introduction

Detection and identification of bacteria is a cornerstone to the modern lifestyle in all spheres of society, as waterborne illnesses and hospital-acquired infections lead to 2.2 million deaths every year with worldwide economic aftermath of US\$ 12 billion loss per year (Alhamlan et al., 2015; Ramírez-Castillo et al., 2015). Additionally, dissemination of toxins and multidrug resistance put at risk industrial and commercial sectors (Hanchi et al., 2018). Notwithstanding, bacterial culture and biochemical tests are the gold standards to work-out the quandary. Still, their time-consuming methodologies can take from 24 h up to a week for successful diagnosis. Additionally, these tests require extensive procedures, including several steps both as pre-enrichment,

selective enrichment in differential broth and biochemical screening, ending up with molecular confirmation through ELISA or other molecular methods established through polymerase chain reaction assay (Mandal et al., 2011; Safavieh et al., 2017).

Aiming to simplify bacterial detection, biosensing approaches offer readiness, sensitivity, and low cost. One can look upon the convenience of a glucose biosensor applied to the challenges of sensing bacteria (Perumal and Hashim, 2014). Electrochemical transducers are a growing solution for microbial biosensors because their simple structure can be used for inexpensive and reusable electrodes. These biosensors can be easily miniaturized to portable devices, integrating analytes' detection in small sample amounts. In this regard, the ever-expanding list of specific recognition elements (natural or synthetic, enzymes,

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: csrandrade@gmail.com, cesar.sandrade@ufpe.br (C.A.S. Andrade).

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126834>

Received 19 January 2021; Received in revised form 23 July 2021; Accepted 28 July 2021

Available online 31 July 2021

0944-5013/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

antibodies, proteins, peptides, and aptamers (Hoyos-Nogués et al., 2018)) to identify microbial targets is in direct relation with the soaring abilities of biosensing platforms. Alternatively, lectins are narrow-specific probes with carbohydrate-binding affinity. They bind successfully to cellular membranes, but their adherence varies accordingly to the diversity and number of saccharides found on them. In like manner, Concanavalin A (ConA) is a lectin obtained from *Canavalia ensiformis* (jack bean), which displays narrow-specificity towards α -glycosyl, α -mannosyl, and α -N-acetylglucosaminyl groups. ConA has been availed in several applications, such as targeting cancerous cells (Chowdhury et al., 2018), as well as separation of cells (Dainiak et al., 2006) and antibodies (Demir et al., 2018). In bacterial biosensing applications, its use has been delimited around Gram-negative bacteria mostly because Gram-positive cell walls are very similar in density and construction within species. However, both Gram-types contain anionic liposaccharide molecules that can compete for ConA interaction. For instance, Gram-negative bacteria outer membrane contain lipopolysaccharide while Gram-positive bacteria cell wall is composed of lipoteichoic acid with a variable polysaccharide component (Archibald and COAPES, 1972).

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogenic Gram-negative bacterium that is commonly multidrug-resistant to antimicrobial agents. Its membrane produces and secretes important effector molecules that are highly hydrophobic and are involved in the triggering of cellular responses and cell attachment. Lipopolysaccharides, anti-phagocytic capsular polysaccharide, siderophores and adhesins are some of its membranal virulence factors associated to extraintestinal infections (Lee et al., 2012). On the other hand, the membrane of Gram-positive *Bacillus subtilis* is composed by diacylglycerol-based lipids, glycolipids, phosphatidylethanolamine, lysylphosphatidylglycerol and cardiolipin (Salzberg and Helmann, 2008). The major components of its cell wall are lipoteichoic acid, peptidoglycan, anionic phosphate-rich polymers. Additionally, *B. subtilis* produces Poly-*N*-acetylglucosamine as an essential component of pellicle formation during biofilm matrix formation (Roux et al., 2015). *Enterococcus faecalis* is a Gram-positive bacterium that is part of the human gastrointestinal microbiota and a common opportunistic pathogen in nosocomial infections. Its cell membrane is mainly composed by palmitic acid, cis-vaccenic acid and cis-9,10- methyleneoctadecanoic acid (Chilambi et al., 2018). Lipoteichoic acid and capsular polysaccharides are the main components of its cell wall (Hufnagel et al., 2014), they significantly contribute to its adherence and invasion of host tissues, biofilm formation, resistance to phagocytosis and virulence (Geiss-Liebisch et al., 2012).

In this work, we demonstrate that ConA is sufficiently responsive to Gram-positive bacteria and that its biorecognition response can be efficiently measured provided that a suitable transducer is used for this purpose. The bacterial cell wall is constructed mainly of peptidoglycan (GlcNAc and N-acetylmuramic acid cross-linked chains). According to their thickness and specific architecture, bacteria can be classified into two major groups: Gram-negative and Gram-positive (Ahmed et al., 2014). Gram-negative bacteria have an outer lipopolysaccharide (LPS) layer composed of lipid A (a GlcN-GlcN disaccharide moiety) and O-antigen (an oligosaccharide with repeating O units) which variability in structure and composition grants specific immune response (Caroff and Karibian, 2003). On the other hand, Gram-positive bacteria rely on a thicker peptidoglycan layer (up to 30 nm compared to 10 nm in Gram-negative bacteria) and an equivalent to LPS composed of lipoteichoic acid (LTA) (Herget et al., 2008). In such a way, the carbohydrate-binding activity of ConA was explored to interact with saccharides and glycoconjugates on the surface of bacterial cells. The platforms explored in this work were both initially constructed from a self-assembled 4-mercaptobenzoic acid (MBA) monolayer deposited over a gold working electrode. Its carboxyl groups were then availed to immobilize both platforms covalently, one constructed from chitosan-capped magnetic nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Chit}$) and the other

from amine-functionalized gold-decorated magnetic nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES}$). Concanavalin A was then immobilized as the biological recognition probe aiming to explore which transducer would enhance its biorecognition abilities.

The stepwise assembly procedure of both platforms was characterized by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM). Since this study explores the enhancement of electrical signaling, evaluated microbial species were Gram-negative *K. pneumoniae* and Gram-positives *B. subtilis* and *E. faecalis*.

2. Experimental

2.1. Materials

4-mercaptobenzoic acid (MBA), iron III chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), iron II sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), (3-amino-propyl)triethoxysilane (APTES), 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), sodium borohydride (NaBH_4), gold (III) chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), chitosan and concanavalin A were purchased from Sigma Aldrich (USA). Potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) and potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) were purchased from Merck (USA). All other chemicals were of analytical grade and used as received. Ultrapure water used throughout the experiments was obtained from a Millipore Milli-Q system (Billerica, USA).

2.2. Microbial strains and culture media

The microorganisms used are stocked in the Tropical Disease Diagnosis Laboratory and were confirmed by MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) prior to conducting tests. The strains *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were cultured on nutrient agar. The bacteria were incubated at 35 °C overnight. Two to three colonies of each microorganism were suspended in sterile saline (NaCl 0.85 g/L). The inocula were prepared using the McFarland 0.5 standard and were standardized on a Genesys 10S Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) adjusted to 625 nm for bacteria with absorbance between 0.08 and 0.1 (CLSI, 2015).

2.3. Instrumentation and measurements

The sensing layer's morphological analysis was performed by atomic force microscopy (AFM) SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japan) in non-contact mode. AFM measurements were operated using 125 μm length, 30 μm width, 4 μm thick non-contact/tapping mode – high resonance frequency silicon probes (Nanoworld, Japan) at a spring constant 42 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ and resonance frequency of 300 kHz. All images were chosen representative from a 100 $\times$ 100 μm area, taken at 24 °C $\pm$ 2 °C with a scanning area of 5 $\times$ 5 μm and a scan rate of 1 Hz line s^{-1} and processed in Gwyddion software.

Before and after bacterial interaction, the electrochemical characterization of the sensor platform was performed using an Autolab potentiostat/galvanostat model PGSTAT 128 N (Ecochemie, The Netherlands) interfaced with NOVA 1.11 software. A three-electrode configuration was used throughout the experiments. A modified gold disk electrode ($\phi=2$ mm) was used as the working electrode, platinum wire as an auxiliary electrode, and silver-silver chloride (Ag/AgCl , saturated KCl 3 M) as a reference electrode. 15 mL of 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1) solution prepared in PBS 10 mM (pH 7) was used as redox couple. CV measurements were recorded between -0.2 to 0.7 V at 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ scan rate. Impedance spectroscopy was performed in a frequency range between 100 mHz–100 kHz at 10 mV amplitude sine wave potential. The Nyquist plots and voltammograms were plotted using the Origin Pro 8 software (OriginLab, USA). Biodetection was carried out according to Zelada-Guillén and coworkers (Zelada-Guillén

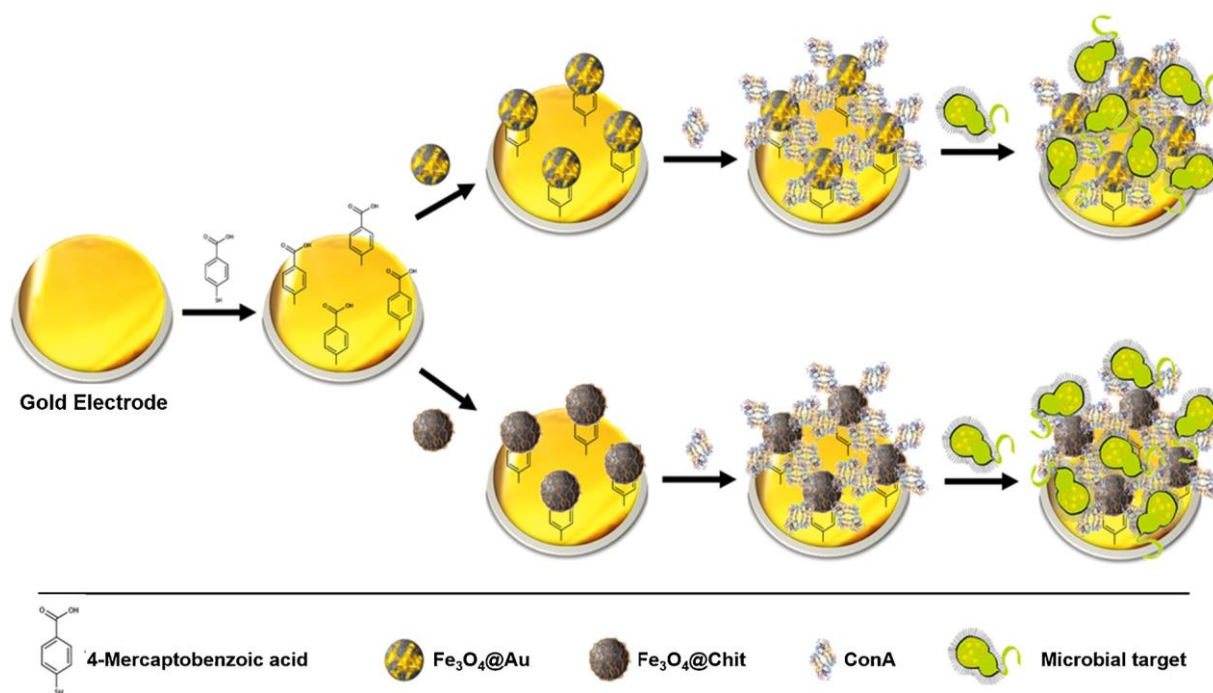


Fig. 1. Schematic illustration of the biosensor assembly process.

et al., 2010) by incubating Fe₃O₄@Au_ConA and Fe₃O₄@Chit_ConA for 10 min in freshly prepared bacterial suspensions at different concentrations ranging 10¹–10⁵ CFU mL^{−1}. Deionized water was used to remove unbound cells, and then the biosensor was subjected to electrochemical analysis. All measurements were performed in triplicate at 24 °C ± °C and under control of the ionic strength to avoid false-positive results. PBS medium (10 mM, pH 7) was chosen to promote superficial charge of the microbial membrane (Ram et al., 2016).

2.4. Synthesis and functionalization of Fe₃O₄@Chit

The chitosan-coated magnetic nanoparticles were prepared according to the co-precipitation method as described in a previous report (Zarnegar and Safari, 2014). Briefly, FeCl₃·6H₂O (8 mM) and FeSO₄·7H₂O (4 mM) were dissolved in deionized water and submitted to vigorous stirring for 10 min. When a homogeneous yellowish solution was obtained, 5 mL of chitosan 2 % (prepared in 0.1 M acetic acid solution) was added dropwise and left to stir for 1 h at 65 °C. Afterward, 5 mL of NH₄OH were injected into the mixture, and immediately, a blackish solution was observed, indicating that Fe₃O₄@Chit were obtained. The solution was maintained in vigorous stirring for another hour while cooling to room temperature. The nanoparticles were collected under a magnetic field and washed until the solution reached pH 7. Finally, Fe₃O₄@Chit were dried in an oven at 35 °C and stored.

2.5. Synthesis and functionalization of Fe₃O₄@Au-APTES

For the synthesis of amine-functionalized gold-decorated Fe₃O₄ (Fe₃O₄@Au) we modified a protocol reported by Salehizadeh et al. (Salehizadeh et al., 2012). Briefly, 100 mg of Fe₃O₄ nanoparticles were dispersed in 50 mM HAuCl₄·3H₂O using an ultrasonic bath at 37 °C ± °C for 1 h and stirred for 40 min. This procedure allowed the adsorption of Au³⁺ in the surface of Fe₃O₄. After that, 0.1 M D-glucose was added to the suspension as a reduction agent and left under magnetic stirring for 1 h at room temperature. The Fe₃O₄@Au were magnetically collected, washed with deionized water, and dried. Amine functionalization was obtained by stirring overnight 100 mg of the previously prepared material in 200 mL 13 mM of APTES ethanolic

solution. Subsequently, the obtained APTES-functionalized nanoparticles were washed three times with deionized water and ethanol by magnetic separation and dried.

2.6. Modification of the working electrode and functionalization with ConA

Prior to each experiment, the surface of the bare gold working electrode (BGE) was freshly polished with 1200-mesh sandpaper and set for 30 min in 2 % NaClO. Afterward, the electrode was washed in ultrapure water inside a sonication bath for 5 min and air-dried. A CV scanning between 0.7 and −0.2 V in 10 mM [Fe(CN)₆]^{4−/3−} was performed until a characteristic clean gold CV curve was obtained. The electrode was then placed in a 50 mM MBA ethanolic solution for 10 min and then air-dried to obtain a self-assembled monolayer (SAM). Thereafter, the carboxylic groups present in the MBA molecules were activated through EDC:NHS coupling agents (0.4 M EDC–0.1 M NHS, 1:1, v/v) for 5 min to form NHS esters (Silva Junior et al., 2018). Subsequently, 3 µL of rather Fe₃O₄@Au-APTES or Fe₃O₄@Chit were dropped over the MBA_EDC:NHS-modified electrode and left to incubate for 10 min to obtain the platforms. After modification of working electrodes was completed, they were submerged in a 10 % glutaraldehyde aqueous solution. After 5 min, the electrodes were washed and dried. Subsequently, 3 µL of a 1 mg mL^{−1} ConA solution prepared in PBS (pH 7) were dropped over the platform aiming to the covalent immobilization of the remaining free amino groups present in the surface of the Fe₃O₄@Au-APTES and Fe₃O₄@Chit systems. After 30 min, the platforms were thoroughly washed with deionized water after each assembly step to remove unbounded molecules and materials. Fig. 1 shows a schematic illustration of the biosensor assembly process.

3. Results and discussion

3.1. Optical and morphological analyses

AFM technique was used to investigate the electrode surface's topological changes during the assembly process of the biosensor and after interaction with bacterial samples. Sample roughness was evaluated

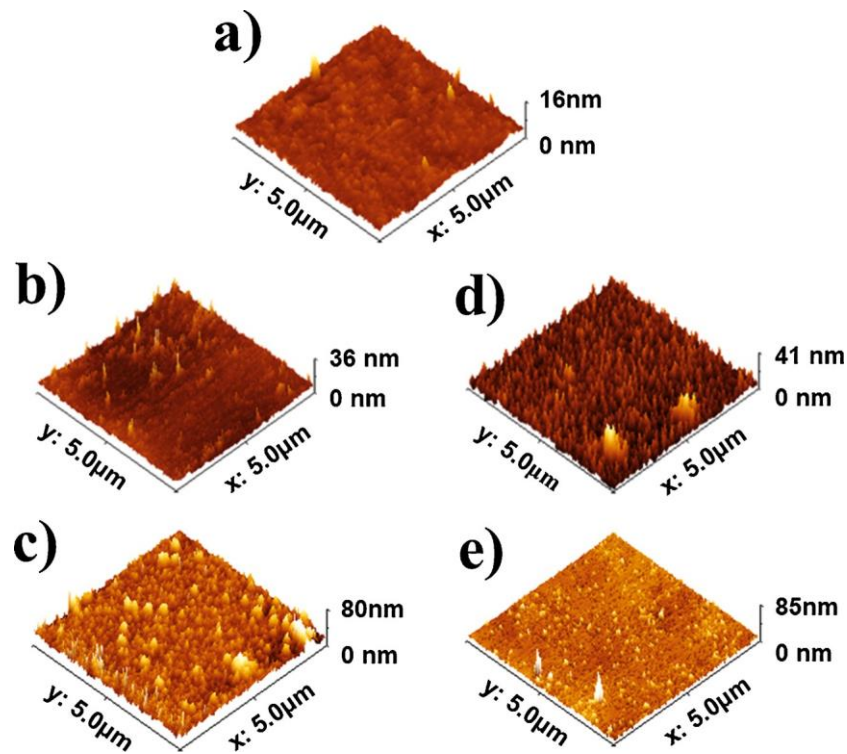


Fig. 2. Representative 3D AFM images of the biosensor. MBA deposited SAM (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Chit}$ (c), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au_ConA}$ (d), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Chit_ConA}$ (e).

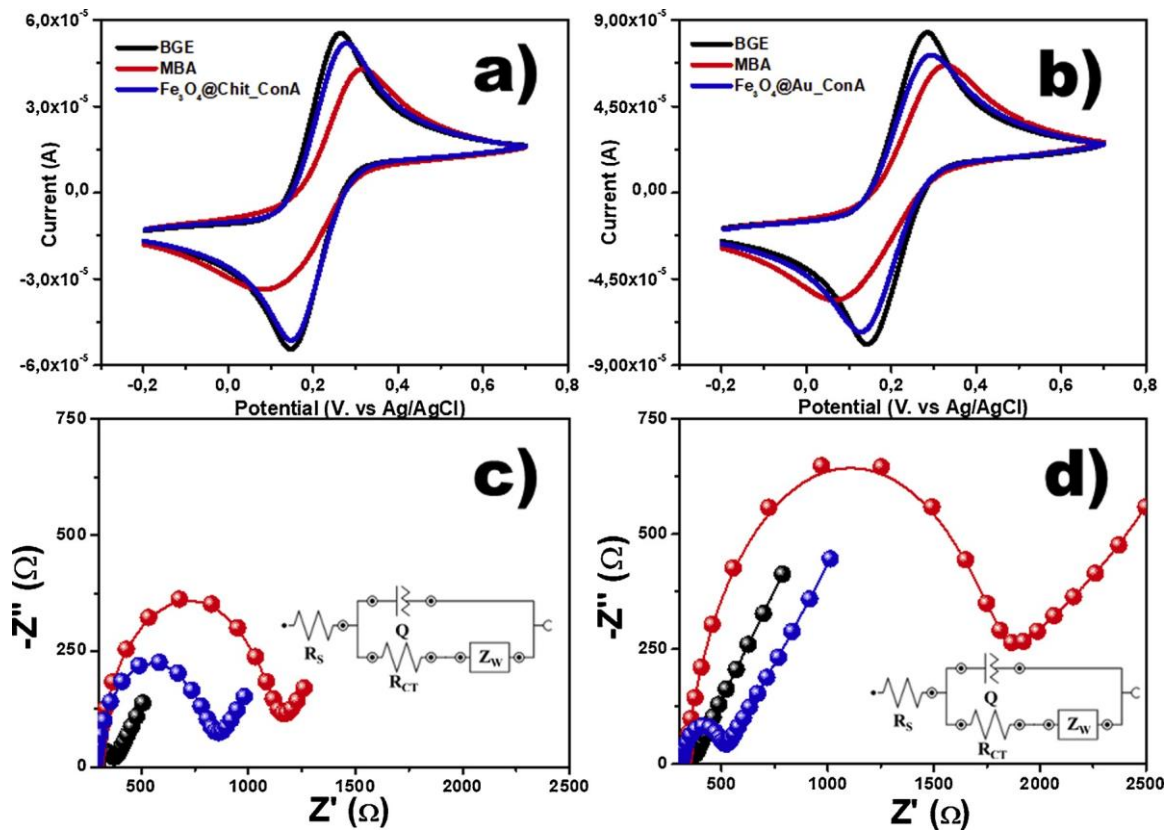


Fig. 3. Voltammograms and Nyquist plots of the biosensor assembly process. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Chit_ConA}$ voltammogram (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au_ConA}$ voltammogram (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Chit_ConA}$ Nyquist plots (c), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au_ConA}$ Nyquist plots (d). BGE (●), MBA (●), ConA (●).

through average roughness (Ra) and root mean square root (Rq) and the asymmetry of the distribution of height was evaluated through skewness parameter (Ssk). After the adsorption of MBA on the gold electrode, in Fig. 2a we observe a smooth homogeneous surface due to the formation of MBA SAM. At this step, $R_a = 3.7$, $R_q = 1.6$ and $Ssk = 2.1$. Height values of 16 nm are in agreement with previous works (Costa et al., 2014; Pensa et al., 2012). In sequence, after the covalent immobilization of $Fe_3O_4@Au$ -APTES (Fig. 2b) and $Fe_3O_4@Chit$ (Fig. 2c), we observe height increases 36 nm ($R_a = 5.4$, $R_q = 2.2$, $Ssk = 1.3$) and 80 nm ($R_a = 7.2$, $R_q = 3.3$, $Ssk = 0.4$), respectively. Both surfaces seem relatively homogeneous, and at this point, we note that $Fe_3O_4@Au$ -APTES system is fine-grained and almost half the size of $Fe_3O_4@Chit$. Subsequently, after the immobilization of ConA, a change in the system's roughness was obtained, and the platform heights increased to 41 nm (Fig. 2d; $R_a = 7.6$, $R_q = 4.0$, $Ssk = 1.6$) and 85 nm (Fig. 2e; $R_a = 12.18$, $R_q = 3.192$, $Ssk = 2.9$), respectively. In both platforms, the immobilization of ConA resulted in a 5 nm height increase; these results are supported by previous studies (Andrade et al., 2015; Sá et al., 2020). The biosensors' interaction was confirmed for all bacterial samples. AFM images are shown in supplementary information Fig. S1a–f. The specific interaction with all bacteria resulted in a noticeable increase in height and topography changes. Such data indicates that the sensor was able to recognize all bacteria.

3.2. Electrochemical characterization of sensor platforms

Voltammetric and impedimetric analyses were performed in $[Fe(CN)_6]^{3-}$ as a redox probe. Both techniques are useful for exploring probe-target interactions since mass immobilization over the electrode surface produces physical hindrance for the redox probe's electrochemical behavior. Additionally, other reactions occurring at the electrode/electrolyte interface carry information about the capacitive nature of the electrical double layer (EDL), such as observed in the development of these nanostructured biosensors. Fig. 3 shows the characterization of both studied platforms (regular and hierarchized) in three different electrodes each. Anodic and cathodic peaks revealed expressive changes in the voltammograms during the electrode's functionalization (Fig. 3a, b). At the same time, reversible redox reactions indicate that the platforms are maintained unaltered after potential sweeping. Cyclic voltammetry revealed that clean BGE responses are well-defined, showing a clean and conductive electrode and a peak-to-peak separation (ΔE_p) of 114.75 mV. One can observe a marked decrease in both current peaks after BGE was exposed to MBA solution. This phenomenon suggests a blocking effect of the electron transfer, for the most likely induced by the formation of strong gold-thiol (Au-S) bonds produced after the self-arrangement of thiol radicals during the formation of the homogeneous monolayer (Xue et al., 2014). Although well packed, MBA molecules serve as a spacer and create stable pathways for the redox pair's motility since well-defined peaks are still visible, thus enhancing the biosensor performance (González et al., 2014). The peak currents shift after immobilization of $Fe_3O_4@Chit$ -ConA and $Fe_3O_4@Au$ -ConA. Although it was expected for ConA to hinder further $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ions from undergoing redox reaction at the electrode surface, the increase in conductivity demonstrates that nanostructure delivers enhanced transducing features (Katz, 2019).

Electrochemical impedance spectroscopy was used to characterize the platforms during their assembly process by analyzing their electrical response as Nyquist plots presented in Fig. 3c and d. All responses displayed a semicircle followed by a tilted line at higher frequencies.

Therefore, all EIS impedance spectra were mathematically fitted to a Randles-like equivalent circuit (inserted in Fig. 3c and d), which simulates the electrode surface's interfacial interaction and the redox probe. The elements composing the equivalent circuit are electrolyte resistance (R_s) in series with a constant phase element (CPE) found in parallel with charge transfer resistance (R_{CT}) and Warburg impedance (Z_w). Whilst R_s and Z_w elements represent bulk properties of the electrolyte solution,

Table 1

Data of the equivalent circuit elements from fitted impedance results for bacteria recognition performed by $Fe_3O_4@Au$ -Chit (a) and $Fe_3O_4@Au$ -ConA (b).

Modified Electrode	CFU mL ⁻¹	R_{CT} (k Ω)	CPE (μ F)	R_s	W
$Fe_3O_4@Au$ -Chit	–	0.19	1.23	0.31	0.85
<i>K. pneumoniae</i>	10 ¹	0.72	2.07	0.30	1.33
<i>K. pneumoniae</i>	10 ²	1.10	1.73	0.27	1.32
<i>K. pneumoniae</i>	10 ³	1.52	1.62	0.27	1.25
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁴	1.85	1.53	0.27	1.21
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁵	2.29	1.46	0.27	1.16
<i>B. subtilis</i>	10 ¹	0.91	1.35	0.27	1.4
<i>B. subtilis</i>	10 ²	1.45	1.19	0.28	1.31
<i>B. subtilis</i>	10 ³	1.97	1.13	0.27	1.22
<i>B. subtilis</i>	10 ⁴	2.35	1.09	0.27	1.12
<i>B. subtilis</i>	10 ⁵	2.70	1.10	0.28	1.09
<i>E. faecalis</i>	10 ¹	1.23	1.81	0.28	1.48
<i>E. faecalis</i>	10 ²	1.65	1.55	0.27	1.37
<i>E. faecalis</i>	10 ³	1.98	1.37	0.27	1.27
<i>E. faecalis</i>	10 ⁴	2.45	1.33	0.28	1.13
<i>E. faecalis</i>	10 ⁵	2.87	1.23	0.29	1.06
$Fe_3O_4@Au$ -ConA	–	0.55	1.47	0.28	1.45
<i>K. pneumoniae</i>	10 ¹	0.36	0.71	0.32	0.74
<i>K. pneumoniae</i>	10 ²	0.48	0.66	0.31	0.65
<i>K. pneumoniae</i>	10 ³	0.58	0.64	0.31	0.57
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁴	0.67	0.63	0.31	0.50
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁵	0.78	0.63	0.31	0.47
<i>B. subtilis</i>	10 ¹	0.56	1.1	0.32	0.55
<i>B. subtilis</i>	10 ²	0.92	0.91	0.32	0.50
<i>B. subtilis</i>	10 ³	1.30	0.79	0.33	0.45
<i>B. subtilis</i>	10 ⁴	1.80	0.68	0.33	0.44
<i>B. subtilis</i>	10 ⁵	2.30	0.64	0.33	0.43
<i>E. faecalis</i>	10 ¹	0.76	0.87	0.30	0.76
<i>E. faecalis</i>	10 ²	1.40	0.80	0.29	0.58
<i>E. faecalis</i>	10 ³	1.90	0.74	0.30	0.50
<i>E. faecalis</i>	10 ⁴	2.50	0.71	0.29	0.40
<i>E. faecalis</i>	10 ⁵	3.10	0.71	0.30	0.41

CPE and R_{CT} define the dielectric and isolating aspects of the transducing platform (Saxena and Srivastava, 2019). R_{CT} is a convenient parameter in electrochemical characterization because of its close relationship with the actual electrode surface. Its value can be directly inferred from the changes in semicircle diameter after physicochemical binding of targets to the electrode's probe.

Additionally, its behavior can help elucidate the physical phenomena at the electrode surface regarding electron current and resistance. Therefore, R_{CT} analytical signals are directly proportional to the mass deposited over the gold electrode during the biosensor construction (Ram et al., 2016). The characterization initiates with the bare gold electrode response after the cleaning process. BGE displays an almost non-existing semicircle with a large Warburg diffusion ruling the spectrum. This behavior is characteristic of clean metal surfaces where the redox probe's diffusion kinetics are unrestricted over the planar electrode. After the chemisorption of MBA, the interfacial resistance increased largely as clear indication of the formation of its monolayer, and differences in magnitude between electrodes are simply caused by area size differences. The most outstanding result comes after the immobilization of the nanostructured transducers. For instance, the covalent immobilization of $Fe_3O_4@Au$ -ConA resulted in a much smaller resistance than $Fe_3O_4@Chit$ -ConA. A clear corroboration of the results obtained by cyclic voltammetry regarding the enhanced conductivity of hierarchized $Fe_3O_4@Au$ platform.

3.3. Analytical performance of the biosensor

EIS is a convenient tool to evaluate narrow-specific electrochemical biosensor platforms for bacterial identification because it allows the detection and differentiation of the electrical responses according to the amount of blocking material deposited after the probe-target interactions. Any alteration occurring at the biosensor's surface will change the electrochemical behavior of the redox probe and can be

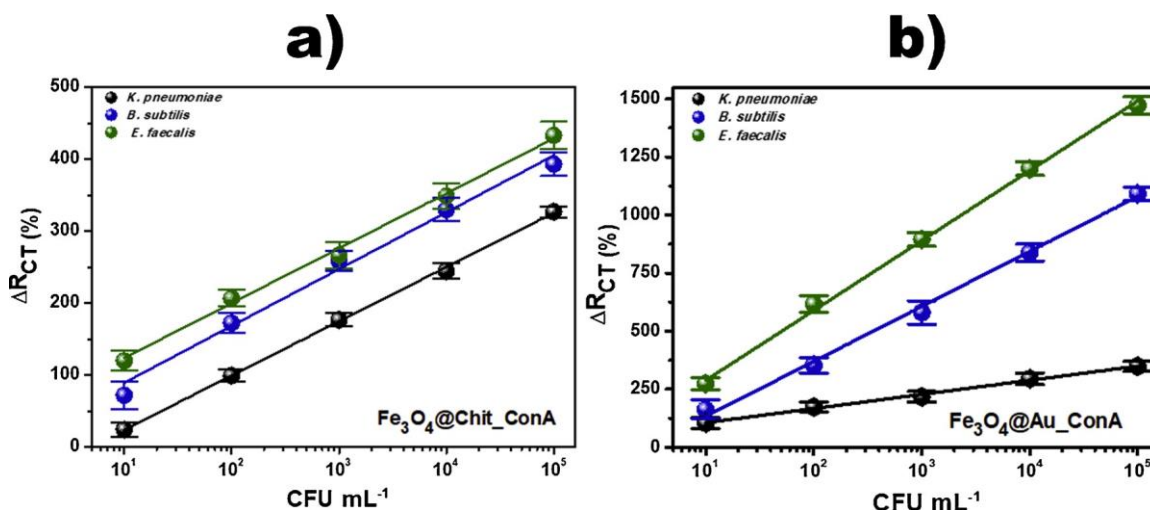


Fig. 4. ΔR_{CT} (%) of the ConA functionalized biosensors after exposure to different bacteria CFU mL⁻¹ concentrations. $Fe_3O_4@Chit_ConA$ (a), $Fe_3O_4@Au_ConA$ (b).

easily explored by EIS. It is noticeable that most expressive changes among all components in the circuit after bacterial adhesion were related to CPE and R_{CT} . While CPE is intrinsically associated with variations of the biosensor's active area, such as EDL thickness, R_{CT} carries information about superficial changes related to hindered kinetics of the redox probe after probe-target interaction (Córdoba-Torres et al., 2015). Changes in R_{CT} suggest that the events occurring at the surface of the biosensor are directly proportional to the concentration of the bacterial sample the biosensor was exposed to. All data obtained from the fitting of responses to the equivalent circuit are shown in Table 1. These results indicate that our platforms could detect all three bacterial species at different concentrations through increasing R_{CT} values.

On the other hand, we note that EDL CPE values decrease only to a very limited extent. This effect is associated with the reduction of free probe sites (effective surface area of the electrode) on both platforms (Saxena and Srivastava, 2019). The performance of the platforms was evaluated, considering the relative variation of the electron transfer resistance (ΔR_{CT}), as follows:

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT(bac)} - R_{CT(biosensor)}}{R_{CT(biosensor)}} \times 100$$

where $R_{CT(bac)}$ is the value of the resistance to charge transfer after exposure to bacterial suspensions and $R_{CT(biosensor)}$ is the R_{CT} value for the $Fe_3O_4@Au_ConA$ or $Fe_3O_4@Chit_ConA$ platforms. Fig. 4a and b show ΔR_{CT} in percentage relative to bacterial adherence on the sensor surface. All values were found to be directly proportional to CFU mL⁻¹ concentrations. Limit of detection (LOD) was estimated as equal to 3.3 σ/s , where σ is the S.D. of the intercept of the regression line and s is the slope of the calibration curve. $Fe_3O_4@Chit_ConA$ calibration curves resulted in the following values: *K. pneumoniae*, $\Delta R_{CT} = -51.5 + 32.7 \ln(CFU mL^{-1})$ with a LOD of 0.3; *B. subtilis*, $\Delta R_{CT} = 10.2 + 34.2 \ln(CFU mL^{-1})$ with a LOD of 1.4 and *E. faecalis*, $\Delta R_{CT} = 47.3 + 33.1 \ln(CFU mL^{-1})$ with a LOD of 0.8. In the same way, calibration curves were calculated for $Fe_3O_4@Au_ConA$ platform resulting in the following values: *K. pneumoniae*, $\Delta R_{CT} = 45.8 + 26.4 \ln(CFU mL^{-1})$ with a LOD of 1; *B. subtilis*, $\Delta R_{CT} = -102.9 + 102.7 \ln(CFU mL^{-1})$ with a LOD of 0.8 and finally, *E. faecalis*, $\Delta R_{CT} = -12.0 + 130.6 \ln(CFU mL^{-1})$ with a LOD of 0.5. Obtained LODs for both platforms were lower than those needed to diagnose clinical conditions. Bacteremia and bacteriuria conditions result in up to 15 CFU mL⁻¹ and 10²–10⁴ CFU mL⁻¹ in blood and urine, respectively (Park et al., 2012; Tullus, 2019). Although our results show a direct relationship between ΔR_{CT} values and bacterial concentrations, Gram-positive responses obtained from $Fe_3O_4@Chit_ConA$ were overlapped by S.D. and therefore unreliable for differentiation.

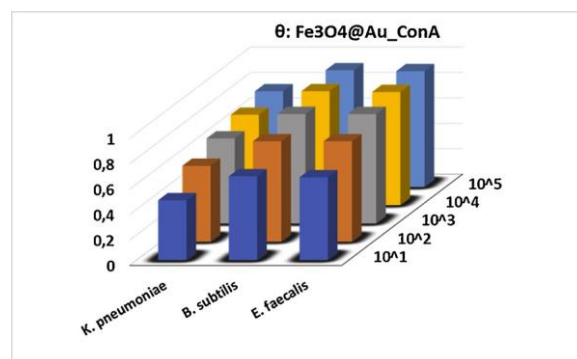


Fig. 5. Surface coverage of $Fe_3O_4@Au_ConA$ sensor layer (θ) as a function of bacteria concentration.

Gram-positive bacteria were only differentiated by $Fe_3O_4@Au_ConA$, thus indicating that this platform could be used as a useful quantitative biosensor. For the most likely, these results are correlated to the size and physical distribution of ConA probes over the transducers. For instance, after the immobilization of ConA, AFM images of $Fe_3O_4@Chit$ platform show coarse agglomerates rather than the refined $Fe_3O_4@Au$ platform surface. Therefore, because of its size and higher available area, ConA should find a better distribution over $Fe_3O_4@Au$ surface, thus improving its contact towards the bacterial cell. As an additional study, we calculated the percentage of biosensor coverage area (θ) to assess the degree of biological recognition performed with $Fe_3O_4@Au_ConA$ as follows:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT(plat)}}{R_{CT(bac)}}$$

where $R_{CT(plat)}$ is the resistance to electron transfer of the biorecognition sensing layer $Fe_3O_4@Au_ConA$ and $R_{CT(bac)}$ is the R_{CT} values after exposure to bacteria. Parameter θ represents the redox probe's kinetics when occupied binding sites arrest the redox probe's motility and therefore indicates the responsiveness of the biosensor surface. We obtained complementary information about the filling of free sensor binding sites after bacterial adherence with this parameter. As observed in Fig. 5, θ values increase right away from the lowest concentration (10¹), and filling of the biosensing platform starts saturation at 10⁴. Considering that sample concentrations increase logarithmically, these results show that hierarchized $Fe_3O_4@Au_ConA$ biosensor generates significantly higher signals at all sample concentrations and thereby the excellent limits of detection obtained.

Table 2Analytical performance of Lectin-based biosensors for microbial detection compared to the MBA-Fe₃O₄@Au-ConA biosensor.

Recognition element	Sensor Platform	Transducer	Limit of detection (CFU mL ⁻¹)	Microbial target	Reference
Lectin (WGA)	Gold chip electrode	Surface Plasmon Resonance	3×10^3 CFU mL ⁻¹	<i>E. coli</i> 0157:H7	(Wang et al., 2013)
Lectin (ConA)	ZnO nanoarrays	Fluorescence Microscopy	10^3 CFU mL ⁻¹	<i>E. coli</i>	(Zheng et al., 2017)
Lectin (ConA)	Gold-coated quartz crystals	Quartz Crystal microbalance	10^4 CFU mL ⁻¹	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	(Serra et al., 2008)
Lectin (ConA)	Screen-printed gold electrode	EIS	5×10^3 CFU mL ⁻¹	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	(Gamella et al., 2009)
Lectin (ConA)	Fe ₃ O ₄ @Au-ConA	CV and EIS	10^1 CFU mL ⁻¹	<i>K. pneumoniae</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. faecalis</i>	This work.

3.4. Mechanisms of interaction towards cellular membranes and cell walls

Among the multiple bacteria sensing elements available, numerous studies in electrochemical biosensors highlight the use of specific probes such as antibodies, nucleic acid sequences, aptamers, among others. For instance, *Salmonella typhimurium* was detected using an impedimetric immunosensor (Farka et al., 2016) with reported LODs of 10^3 CFU mL⁻¹; an electrochemical genosensor for *Bacillus cereus* (Izadi et al., 2016) reported LODs of 10^1 CFU mL⁻¹; and *Pseudomonas aeruginosa* was detected through an impedimetric aptasensor with LODs of 33 CFU mL⁻¹ (Roushani et al., 2019). Recently, a label free immunosensor was fabricated using a screen-printed gold surface to detect *E. coli* 0157 and a LOD of 15 CFU mL⁻¹ where the result was obtained after 30 min (Vu et al., 2021). Such approaches highlight the advantage of specific detection; however, a frequent obstacle in using such probes relies on their fragility and price. For this matter, chemical conditions needed for the covalent immobilization of specific probes neglect their biological recognition ability. Instabilities are created at their recognition site resulting in weak sensitivity and low selectivity (Zhao et al., 2019).

Different strategies have been developed to detect pathogenic microorganisms. Han and coworkers developed an electrochemical biosensor using peptidoglycan as biorecognition element, detecting Gram-positive bacteria with a LOD of 42 CFU mL⁻¹. Lectins have been widely exploited in various biosensor platforms to target bacteria. Although not as specific as antibodies, their sugar-binding ability on the bacterial surface and wide variety stand out this tool as a promising technology for the identification and differentiation of food and water-borne pathogens (Mi et al., 2021). Moreover, these options generally prospect single target detection, and false-positive results are frequent. Therefore, we aim to create innovative alternatives in biosensing devices for point-of-care applications. The use of narrow-specific recognition elements stands out because their sensing abilities are based on their interaction with structural components or various biomolecules. For instance, ConA displays a notorious saccharide-binding affinity towards *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), D-fructose, D-glucose (Glc) and specially α -D-mannose, which stand out as the main complementary target in the residues of complex antennary *N*-glycans (Barre et al., 2019) through hydrogen bonds to C-3, C-4 and C-6 of the pyranosil ring system (Hoang et al., 2019). ConA and other lectins have been used to target specific carbohydrates and glycoproteins in distinct cellular structures like those overexpressed in cancer cells when compared with healthy cells (Chowdhury et al., 2018), implemented in microbial recognition (Zheng et al., 2017), and detection of viruses (Simão et al., 2020).

Our results suggest that the adhesion of bacteria to ConA biosensing layers form lectin-bacteria complexes that behave as physical hindrances of the redox pair, preventing it from reaching the electrode surface and consequently increasing the electron transfer resistance. Diverse response patterns are obtained according to the number of immobilized cells, depending on their specific combination of membrane saccharides and how they interact with ConA. However, even though interaction is formed, sometimes the biorecognition process can't be handled by the transducer, also when membrane composition

has small differences between targets, obtained signals can overlap preventing a correct discrimination. For these reason, some reports draw attention to the use of hierarchized nanostructured transducers as an alternative to overcome these drawbacks (He et al., 2016; Lee et al., 2018).

Our results are in accordance with previous reports that found that refined nanostructuring (hierarchization) with smaller nanostructures over another nanoparticle enhance the transduced response (Thamilselvan et al., 2019; Zhou et al., 2012). Hence, narrow-specific biological probes currently disregarded for the detection of Gram-positive bacteria, such as ConA, have their biorecognition abilities improved. In this sense, the decoration of Fe₃O₄ nanoparticles appears to be more efficient than chitosan-capped Fe₃O₄ nanoparticles, given that smaller gold nanoparticles greatly enhance the performance of electron transfer. In this work, we show that besides granting high sensitivity, the hierarchization of nanostructures is a relevant approach to improve the transduced electrical response emerging from the biorecognition process. Therefore, when similar but not identical targets are being studied, their discrimination occurs straightforward. In this context, our hierarchized platform shows not only higher R_{CT} values for all bacterial samples regardless of their Gram-type but efficient discrimination between *B. subtilis* and *E. faecalis*. Accordingly, these results emphasize the ability of ConA lectin to detect and differentiate between bacterial strains provided that the right hierarchized nanostructured transducer is used in the platform. In Table 2 we present a summary of lectin-based whole bacteria biosensors. Of note, all the reports found in regard to ConA-based biosensors emphasize their use for Gram-negative bacteria. Independently from the transducing technique, all biosensors attained LODs from 10^3 to 10^4 CFU mL⁻¹. Some studies report the sensing of both Gram-type bacteria through ConA biointeraction, but signal overlapping between them are indisputable drawbacks for the further implementation of these biosensors, even for electrochemical impedance spectroscopy (Serra et al., 2008).

Additionally, when a signal of differentiation can be attained through lectin adhesion enhancements, other Gram-positive bacteria are to be excluded from the study's scope (Gamella et al., 2009). On that account, our results show that the transducing platform's hierarchization is the alternative to avail the full competence of narrow-specific probes. For that matter, Fe₃O₄@Au-ConA platform attained even lower LODs, which represent the limit at which uncertainty increases when the concentration tends to zero. In other words, rather than implying that less than a cell was detected, these small values assure the linearity of the biosensing response within the range of study and therefore the accuracy of the measurements.

4. Conclusions

In the present paper, we have shown that the fine nanostructuring (hierarchization) of nanostructured transducers enhance the biorecognition abilities of biological probes. AFM analyses confirmed the construction of hierarchized platforms and the interaction of both Gram-types towards the biosensor. Furthermore, impedimetric and amperometric results indicate that hierarchization of Fe₃O₄@Au-ConA platform

dramatically enhances the performance of electron transfer, reducing its resistance and therefore attaining more significant discrimination between very similar targets. Moreover, the rate of reduction of free probe sites after the logarithmical increase of bacterial concentrations demonstrates the responsiveness of the biosensor and the accuracy of the measurements. Therefore, we highlight the strong potential of finely tuned hierarchized nanostructured transducers to detect and discriminate microbial threats in complex samples when employing narrow-specific biological probes such as ConA. Our results suggest a promising strategy that could be extended to the design of EIS biosensors for highly sensitive and rapid detection of other desired bacteria.

CRedit authorship contribution statement

Alberto G. da Silva Junior: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Isaac A.M. Frias:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Reginaldo G. Lima-Neto:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Sandra R. Sá:** Methodology, Investigation, Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision. **Maria D.L. Oliveira:** Methodology, Investigation, Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition. **César A.S. Andrade:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 314894/2018-7, 314756/2018-3 and 435059/2018-1), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Science and Technology Support Foundation of Pernambuco State/FACEPE (BCT-0056-2.09/18). Isaac A. M. Frias would like to thank FACEPE for the postdoctoral fellowship (APQ-0437-4.03/17). Alberto G. Silva Júnior would like to thank CAPES for the PhD scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126834>.

References

- Ahmed, A., Rushworth, J.V., Hirst, N.A., Millner, P.A., 2014. Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 631–646. <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13>.
- Alhamlan, F.S., Al-Qahtani, A.A., Al-Ahdal, M.N., 2015. Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries. *J. Infect. Dev. 9*, 128–135. <https://doi.org/10.3855/jidc.6101>.
- Andrade, C.A.S., Nascimento, J.M., Oliveira, I.S., de Oliveira, C.V.J., de Melo, C.P., Franco, O.L., Oliveira, M.D.L., 2015. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.037>.
- Archibald, A.R., Coopes, H.E., 1972. Blocking of bacteriophage receptor sites by Concanavalin A. *Microbiology* 73, 581–585.
- Barre, A., Bourne, Y., Van Damme, E.J.M., Rougé, P., 2019. Overview of the structure–function relationships of mannose-specific lectins from plants, Algae and Fungi. *Int. J. Mol. Sci.* 20 <https://doi.org/10.3390/ijms20020254>.
- Caroff, M., Karibian, D., 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 338, 2431–2447. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.010>.
- Chilambi, G.S., Gao, I.H., Yoon, B.K., Park, S., Kawakami, L.M., Ravikumar, V., Chan-Park, M.B., Cho, N.-J., Bazan, G.C., Kline, K.A., 2018. Membrane adaptation limitations in *Enterococcus faecalis* underlie sensitivity and the inability to develop significant resistance to conjugated oligoelectrolytes. *RSC Adv.* 8, 10284–10293.
- Chowdhury, A.D., Ganganboina, A.B., Park, E.Y., Doong, R., 2018. Impedimetric biosensor for detection of cancer cells employing carbohydrate targeting ability of Concanavalin A. *Biosens. Bioelectron.* 122, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.039>.
- Córdoba-Torres, P., Mesquita, T.J., Nogueira, R.P., 2015. Relationship between the origin of constant-phase element behavior in electrochemical impedance spectroscopy and electrode surface structure. *J. Phys. Chem. C* 119, 4136–4147. <https://doi.org/10.1021/jp512063f>.
- Costa, M.P., Andrade, C.A.S., Montenegro, R.A., Melo, F.L., Oliveira, M.D.L., 2014. Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor. *J. Colloid Interface Sci.* 433, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.07.014>.
- Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2006. Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *J. Chromatogr. A* 1123, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.089>.
- Demir, E.F., Kuru, C.I., Uygun, M., Aktaş Uygun, D., Akgöl, S., 2018. Antibody separation using lectin modified poly(HEMA-EDMA) hydrogel membranes. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 29, 344–359. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1417197>.
- Farka, Z., Jurík, T., Pastucha, M., Kovář, D., Lacina, K., Skládal, P., 2016. Rapid immunosensing of *Salmonella typhimurium* using electrochemical impedance spectroscopy: the effect of sample treatment. *Electroanalysis* 28, 1803–1809. <https://doi.org/10.1002/elan.201600093>.
- Gamella, M., Campuzano, S., Parrado, C., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2009. Microorganisms recognition and quantification by lectin adsorptive affinity impedance. *Talanta* 78, 1303–1309. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.01.059>.
- Geiss-Liebisch, S., Rooijakkers, S.H.M., Beczala, A., Sanchez-Carballo, P., Kruszynska, K., Repp, C., Sakinc, T., Vinogradov, E., Holst, O., Huebner, J., 2012. Secondary cell wall polymers of *Enterococcus faecalis* are critical for resistance to complement activation via mannose-binding lectin. *J. Biol. Chem.* 287, 37769–37777.
- González, M.C.R., Orive, A.G., Carro, P., Salvarezza, R.C., Creus, A.H., 2014. Structure and electronic and charge-transfer properties of mercaptobenzoic acid and mercaptobenzoic acid — undecanethiol mixed monolayers on Au (111). *J. Phys. Chem. C* 118, 30013–30022.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R., 2018. The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Front. Microbiol.* 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>.
- He, C., Xie, M., Hong, F., Chai, X., Mi, H., Zhou, X., Fan, L., Zhang, Q., Ngai, T., Liu, J., 2016. A highly sensitive glucose biosensor based on gold nanoparticles/bovine serum albumin/Fe3O4 biocomposite nanoparticles. *Electrochim. Acta* 222, 1709–1715.
- Herget, S., Toukach, P.V., Ranzinger, R., Hull, W.E., Knirel, Y.A., Von Der Lieth, C.W., 2008. Statistical analysis of the bacterial carbohydrate structure data base (BCSDB): characteristics and diversity of bacterial carbohydrates in comparison with mammalian glycans. *BMC Struct. Biol.* 8 <https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-35>.
- Hoang, T.B., Stokke, B.T., Hanke, U., Johannessen, A., Johannessen, E.A., 2019. The characterisation and quantification of immobilised Concanavalin A on quartz surfaces based on the competitive binding to glucose and fluorescent labelled dextran. *Appl. Sci.* 9 <https://doi.org/10.3390/app9020318>.
- Hoyos-Nogués, M., Gil, F.J., Mas-Moruno, C., 2018. Antimicrobial peptides: powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies. *Molecules* 23, 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules23071683>.
- Hufnagel, M., Sixel, K., Hammer, F., Kroppe, A., Sava, I.G., Theilacker, C., Berner, R., Huebner, J., 2014. Detection of opsonic antibodies against *Enterococcus faecalis* cell wall carbohydrates in immune globulin preparations. *Infection* 42, 749–755.
- Izadi, Z., Sheikh-Zeinoddin, M., Ensafi, A.A., Soleimani-Zad, S., 2016. Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. *Biosens. Bioelectron.* 80, 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.032>.
- Katz, E., 2019. Synthesis, properties and applications of magnetic nanoparticles and nanowires—a brief introduction. *Magnetochemistry* 5, 61. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5040061>.
- Lee, J.C., Lee, E.J., Lee, J.H., Jun, S.H., Choi, C.W., Kim, S.I., Kang, S.S., Hyun, S., 2012. *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol. Lett.* 331, 17–24.
- Lee, J., Morita, M., Takemura, K., Park, E.Y., 2018. A multi-functional gold/iron-oxide nanoparticle-CNT hybrid nanomaterial as virus DNA sensing platform. *Biosens. Bioelectron.* 102, 425–431.
- Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K., 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am. J. Food Technol.* <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.87.102>.
- Mi, F., Guan, M., Hu, C., Peng, F., Sun, S., Wang, X., 2021. Application of lectin-based biosensor technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria: a review. *Analyst* 146, 429–443. <https://doi.org/10.1039/d0an01459a>.
- Park, S.Y., Park, K.H., Bang, K.M., Chong, Y.P., Kim, S.H., Lee, S.O., Choi, S.H., Jeong, J. Y., Woo, J.H., Kim, Y.S., 2012. Clinical significance and outcome of polymicrobial *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Infect.* 65, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.02.015>.
- Pensa, E., Rubert, A.A., Benitez, G., Carro, P., Orive, A.G., Creus, A.H., Salvarezza, R.C., Vericat, C., 2012. Are 4-mercaptopbenzoic acid self assembled monolayers on Au (111) a suitable system to test adatom models? *J. Phys. Chem. C* 116, 25765–25771. <https://doi.org/10.1021/jp306545v>.
- Perumal, V., Hashim, U., 2014. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. *J. Appl. Biomed.* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>.
- Ram, Y., Yoetz-Kopelman, T., Dror, Y., Freeman, A., Shacham-Diamand, Y., 2016. Impact of molecular surface charge on biosensing by electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta* 200, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.162>.
- Ramírez-Castillo, F., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F., Harel, J., Guerrero-Barrera, A., 2015. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens* 4, 307–334. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>.

- Roushani, M., Sarabaegi, M., Pourahmad, F., 2019. Impedimetric aptasensor for *Pseudomonas aeruginosa* by using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles. *Microchim. Acta* 186. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3858-y>.
- Roux, D., Cywes-Bentley, C., Zhang, Y.-F., Pons, S., Konkol, M., Kearns, D.B., Little, D.J., Howell, P.L., Skurnik, D., Pier, G.B., 2015. Identification of poly-N-acetylglucosamine as a major polysaccharide component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *J. Biol. Chem.* 290, 19261–19272.
- Sá, S.R., Junior, A.G.S., Lima-Neto, R.G., Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., 2020. Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic candida species. *Talanta* 220, 121375. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121375>.
- Safavieh, M., Coarsey, C., Esiobu, N., Memic, A., Vyas, J.M., Shafiee, H., Asghar, W., 2017. Advances in Candida detection platforms for clinical and point-of-care applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1167667>.
- Salehizadeh, H., Hekmatian, E., Sadeghi, M., Kennedy, K., 2012. Synthesis and characterization of core-shell Fe 3O 4-gold-chitosan nanostructure. *J. Nanobiotechnology* 10, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-3>.
- Salzberg, L.I., Helmann, J.D., 2008. Phenotypic and transcriptomic characterization of *Bacillus subtilis* mutants with grossly altered membrane composition. *J. Bacteriol.* 190, 7797–7807.
- Saxena, R., Srivastava, S., 2019. An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit. *Sensors Actuators, B Chem.* 297, 126780 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126780>.
- Serra, B., Gamella, M., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M., 2008. Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1853–1860. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2141-6>.
- Silva Junior, A.G., Oliveira, M.D.L., Oliveira, I.S., Lima-Neto, R.G., Sá, S.R., Franco, O.L., Andrade, C.A.S., 2018. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin A peptide for bacterial detection. *Sensors Actuators, B Chem.* 255, 3267–3274. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.153>.
- Simão, E.P., Silva, D.B.S., Cordeiro, M.T., Gil, L.H.V., Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., 2020. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. *Talanta* 208, 120338. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120338>.
- Thamilselvan, A., Manivel, P., Rajagopal, V., Nesakumar, N., Suryanarayanan, V., 2019. Improved electrocatalytic activity of Au@ Fe3O4 magnetic nanoparticles for sensitive dopamine detection. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 180, 1–8.
- Tullus, K., 2019. Defining urinary tract infection by bacterial colony counts: a case for 100,000 colonies/ml as the best threshold. *Pediatr. Nephrol.* 34, 1651–1653. <https://doi.org/10.1007/s00467-019-04283-x>.
- Vu, Q.K., Tran, Q.H., Vu, N.P., Anh, T.Le, Dang, T.T.Le, Matteo, T., Nguyen, T.H.H., 2021. A label-free electrochemical biosensor based on screen-printed electrodes modified with gold nanoparticles for quick detection of bacterial pathogens. *Mater. Today Commun.* 26, 101726 <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101726>.
- Wang, Y., Ye, Z., Si, C., Ying, Y., 2013. Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor. *Food Chem.* 136, 1303–1308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.069>.
- Xue, Y., Li, X., Li, H., Zhang, W., 2014. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. *Nat. Commun.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5348>.
- Zarnegar, Z., Safari, J., 2014. Fe3O4@chitosan nanoparticles: a valuable heterogeneous nanocatalyst for the synthesis of 2,4,5-trisubstituted imidazoles. *RSC Adv.* 4, 20932–20939. <https://doi.org/10.1039/c4ra03176h>.
- Zelada-Guillén, G.A., Bhosale, S.V., Riu, J., Rius, F.X., 2010. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. *Anal. Chem.* 82, 9254–9260. <https://doi.org/10.1021/ac101739b>.
- Zhao, L., Qi, X., Yan, X., Huang, Y., Liang, X., Zhang, L., Wang, S., Tan, W., 2019. Engineering aptamer with enhanced affinity by triple helix-based terminal fixation. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 17493–17497. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09292>.
- Zheng, L., Wan, Y., Qi, P., Sun, Y., Zhang, D., Yu, L., 2017. Lectin functionalized ZnO nanoarrays as a 3D nano-biointerface for bacterial detection. *Talanta* 167, 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.007>.
- Zhou, H., Lee, Jaewook, Park, T.J., Lee, S.J., Park, J.Y., Lee, Jaebom, 2012. Ultrasensitive DNA monitoring by Au–Fe3O4 nanocomplex. *Sensors Actuators B Chem.* 163, 224–232.

APÊNDICE E – ARTIGO 2

**“ELECTROCHEMICAL DETECTION OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA THROUGH
MASTOPARAN-CAPPED MAGNETIC NANOPARTICLE”**



Contents lists available at ScienceDirect

Enzyme and Microbial Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/enzymictec

Electrochemical detection of gram-negative bacteria through mastoparan-capped magnetic nanoparticle

Alberto G. da Silva Junior^{a,b}, Isaac A.M. Frias^{a,b}, Reginaldo G. Lima-Neto^c, Octávio L. Franco^{d,e}, Maria D.L. Oliveira^{a,b}, César A.S. Andrade^{a,b,*}^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil^b Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil^c Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil^d Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil^e S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Biosensor
Magnetic nanoparticles
Antimicrobial peptide
Synoeca-MP
Cyclic voltammetry
Electrochemical impedance

ABSTRACT

The increasing number of multidrug resistance microorganisms is an alarming threat, and their rapid detection is essential to prevent nosocomial, foodborne, or waterborne infections. Many peptides derived from the venom of wasp *Synoeca surinama* have antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Synoeca-MP, an antimicrobial peptide (AMP) from mastoparan family, seems to increase bacterial membrane permeability, promoting cytotoxicity and membrane disruption. Here Synoeca-MP was evaluated as biorecognition element tethered over chitosan-coated magnetic nanoparticles (Fe₃O₄-Chit). The transducing layer of the biosensor was developed from the self-assembling of 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA) monolayer onto gold substrate. Atomic force microscopy (AFM) analyses confirmed the biointeraction between AMP and different pathogens membranes. The fabrication and performance of the biosensing assembly were characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Detection of *Enterococcus faecalis* (G+), *Klebsiella pneumoniae* (G-), *Pseudomonas aeruginosa* (G-), and *Candida tropicalis* was assessed in a recognition range from 10¹ to 10⁵ CFU.mL⁻¹. An instrumental limit of detection of 10 CFU.mL⁻¹ was obtained for each specimen. However, the device presented a preferential selectivity towards Gram-negative bacteria. The proposed biosensor is a sensitive, fast, and straightforward platform for microbial detection in aqueous samples, envisaged for environmental monitoring applications.

1. Introduction

Waterborne infections are some of the leading causes of morbidity and mortality in developing countries. Severe outbreaks are prevalent in the tropical climate, and environmental factors favor the proliferation of bacteria and fungi species [1]. Advanced strategies to prevent illnesses developed by waterborne and foodborne pathogens are to be developed to evade the expected annual economic burden of about U\$ 12 billion dollars [2]. During the utilization of invasive medical devices (intra-vascular catheter, urinary catheter, and endotracheal tube), *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* are frequently found in the bloodstream and respiratory infections [3]. Furthermore, as observed in burn wound infections and candidiasis and candidemia infections, Gram-positive

bacteria such as *E. faecalis* [4] and other pathogens such as *Candida tropicalis* [5] present in healthcare facilities and stand out as primary invasive pathogens.

Traditional detection methodologies, including morphological studies, microscopic analyses, immunological assays, or molecular biology, remain widely used. Although effective, nonspecific microscopy and long waiting times for colony growth after seeding in enriched culture [6,7] are limitations to the health services. Moreover, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative real-time PCR (qPCR) are costly and time-intensive, requiring sample pre-treatment and purification processes [8]. Therefore, innovative approaches for rapid and continuous monitoring of water and food quality are sought to reduce microbial infection cases and support health

* Correspondence to: Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: cesar.sandrade@ufpe.br (C.A.S. Andrade).<https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2022.110088>

Received 10 March 2022; Received in revised form 9 May 2022; Accepted 16 June 2022

Available online 20 June 2022

0141-0229/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

services. Biosensors have become a feasible alternative due to the high demand for health-monitoring devices with fast and sensitive analysis, cost-effectiveness, and portable features [9].

Nanomaterials with enhanced biocompatibility, are desired for the development of biosensing devices. In such a way, the combination of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles with natural polysaccharide chitosan, results in an intrinsically biocompatible nanomaterial with favorable electrical conductivity and high surface/volume ratio. Its active functional groups enable the immobilization of biorecognition molecules [10,11] while performing as signal amplifiers for chemical and biological identification [12,13].

Just like antibodies, enzymes, and oligonucleotides, antimicrobial peptides (AMPs) present biorecognition moieties that can be explored for their selective interactions in biosensing strategies [14]. Synoea-MP is an antimicrobial peptide isolated from *Synoea surinama* wasps venom and composed of the amino acid sequence INWLKLGKKIIASL-NH₂ [15]. Cationic AMPs are inserted in the lipid bilayer through hydrophobic contact and electrostatic interactions with the electronegative surface of microbial membranes and cell walls [16]. Hence, the specific cell wall composition of Gram-positive and Gram-negative bacteria or yeast cells leads to differential interaction with these AMPs, resulting in a unique electrochemical response for each microorganism [17].

This work describes the development of a Synoea-MP modified chitosan-capped magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 -Chit) to detect bacterial and fungal species based on the electrochemical pattern obtained after peptide-microorganism interaction. Biosensor assembly process and evaluation of the microorganism detection were accessed through atomic force microscopy (AFM), cyclic voltammetry (CV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). We evaluated fungal agent (*C. tropicalis*) and Gram-negative (*K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*), Gram-positive (*E. faecalis*) bacteria. To the best of our knowledge, this is the first biosensor platform to integrate the peptide Synoea-MP for differential identification of microorganisms.

2. Experimental

2.1. Materials

Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA), chitosan, potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) and potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) were purchased from Sigma Aldrich (USA). All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received. Ultrapure water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) used in all experiments was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, USA). Peptide Synoea-MP of amino acid sequence (INWLKLGKKIIASL-NH₂) was synthesized by Aminotech (São Paulo, Brazil) using the fluorenylmethyloxycarbonyl (F-moc) technique. Synoea-MP was further purified (purity > 95%), lyophilized, and stored.

2.2. Bacteria and fungi cultivation

Microbial strains were obtained from the Tropical Disease Diagnosis Laboratory (Federal University of Pernambuco, Brazil). Bacteria species (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) were cultivated on nutrient agar. *Candida tropicalis* URM 5732 was grown on Sabouraud dextrose agar. Microbial growth occurred at 37 °C for 24 h. Three colonies of bacterial and fungal cells were harvested, suspended in sterilized saline solution ($\text{NaCl } 0.85 \text{ g L}^{-1}$), centrifuged, and then suspended in sterile phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2. Different concentrations were prepared using McFarland 0.5 standard, separated into five different concentrations (10^1 to 10^5 CFU mL^{-1}) using Genesys 10 S Vis spectrophotometer (Thermo Scientific), 625 nm with absorbance 0.1 for bacteria, and 590 nm with 90% transmittance for yeast [18,19]. The most common way to assess microbial growth in solution is the

measurement of the optical density. OD measures light scattering and not absorbance. Particles in solution scatter light and the scattering is proportional to the number of particles (microorganisms). Therefore, a replicating population of bacteria or yeast increases light scattering and measured absorbance values. At the same time, the absorbance mode is only exploited to determine the extent of light scattering instead of measuring the physical absorbance of light energy by absorbing molecules [20,21].

2.3. Topographic analysis

Morphological analysis of the sensing layer before and after microbial interaction was performed by atomic force microscopy (AFM) using SPM-9700 microscope (Shimadzu Corporation, Japan). AFM measurements were operated using silicon probe cantilevers (Nanoworld, Japan) in a non-contact mode (spring constant 42 N m^{-1} and resonance frequency of 300 kHz). All images were taken at 24 °C (± 2 °C) with a scan area $10 \times 10 \mu\text{m}$ and lateral resolution 512×512 pixels. Gwyddion software was used for image processing.

2.4. Electrochemical measurements

Electrochemical experiments were used to characterize the biosensor fabrication and microbial biorecognition. Voltammetric and impedimetric analyses were performed using a potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT 128 N electrochemical workstation (Metrohm, The Netherlands) at room temperature. A three-electrode electrochemical cell was used. Platinum wire and Ag/AgCl (saturated with KCl 3 M) were used as a counter (CE) and reference electrodes (RE), respectively. The working electrode (WE) was a bare gold electrode (BGE) ($\phi = 2 \text{ mm}$). CV experiments were carried out with the potential scanned from -0.2 – 0.7 V at a scan rate of 50 mV s^{-1} . Impedance spectra were obtained under sine wave potential with amplitude 10 mV and 30 data points distributed over a frequency range from 100 mHz to 100 kHz. Electrochemical studies were performed inside a Faraday cage, and in the presence of 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1, v/v) prepared in phosphate buffer saline (PBS) pH 7 as redox probe [22,23].

2.5. Preparation of Fe_3O_4 -Chit-SynoeaMP nanoparticles

Iron oxide magnetic nanoparticles were prepared by the co-precipitation method in 25 mL of $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (8.5 mM), and 25 mL $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (4.3 mM) dissolved in deionized water and stirred for 10 min. After that, 5 mL of chitosan 2% prepared in 0.05 M acetic acid solution was added dropwise into the mixture and kept under vigorous stirring for 1 h at 70 °C. Then, 5 mL of NH_4OH was poured, and the solution immediately turned deep black, and the pH reached ~ 10 . After reaction at 70 °C for 30 min, Fe_3O_4 -Chit remained under stirring until reaching room temperature. The nanoparticles were collected by a magnet and thoroughly washed with ethanol 70% and deionized water until reaching neutral pH, dried in an oven at 45 °C, and stored. Fe_3O_4 -Chit (50 mg) was suspended in 25 mL of glutaraldehyde 5% and placed on an ultrasonic bath for 1 h to disperse nanoparticles and enable a stable covalent binding between the carbonyl groups of glutaraldehyde and free amino groups of chitosan [24]. Afterward, Fe_3O_4 -Chit was washed three times and then suspended in 1 mg mL^{-1} of Synoea-MP prepared in PBS pH 7, following 1 h of ultrasonic dispersion and 1 h of vigorous stirring. Free amino groups of Synoea-MP reacted with the carbonyl groups of glutaraldehyde, resulting in the Fe_3O_4 -Chit-Synoea-MP. The hybrid composite was stored at 4 °C until use.

2.6. Elaboration of the biosensor and assay performance

BGE was freshly cleaned using a thin 1200-mesh sandpaper and alumina slurry $0.04 \mu\text{m}$, and then ultrasonically washed in ultrapure water for 5 min and dried. Subsequently, BGE was incubated in an

ethanolic solution of 50 mM 4-MBA for 10 min at room temperature to obtain a self-assembled monolayer (SAM). Terminal carboxylic groups of 4-MBA were activated using an aqueous solution of the 0.4 M EDC and 0.1 M NHS (1:1, v/v) for 5 min, resulting in NHS esters [25]. Finally, 4 μ L of the Fe₃O₄-Chit-SynoecaMP was dropped on the MBA-modified surface and set to incubation for 10 min. After each step, the electrode was thoroughly rinsed with deionized water to remove unbound molecules. The developed biosensor is for single use and preferably for testing after assembling the sensor platform to avoid denaturing the immobilized peptide. A schematic representation of the stepwise fabrication of the biosensor is shown in Fig. 1. The biosensor was set to incubation for 5 min in freshly prepared suspensions of *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *Candida tropicalis* [22,26]. The suspensions were prepared in different concentrations under controlled ionic strength using PBS pH 7 to promote the superficial charge of the microorganisms. Thus, matrix effects would be reduced, resulting in a reliable electrochemical response [27,28].

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the biosensor platform

The biosensor platform and its interaction with microorganisms were assessed through 3D AFM images (Fig. 2). The surface roughness was obtained through the average roughness (Sa) and root mean square roughness (RMS). Fig. 2a shows 4-MBA-modified BGE, revealing a well-distributed SAM covering with a height of 34 nm (Sa = 1.608 nm, RMS = 2.128 nm). After the covalent immobilization of Fe₃O₄-Chit-SynoecaMP (Fig. 2b), the mean height increases to 72 nm (Sa = 3.954 nm, RMS = 5.531 nm), showing a slight change in the peak roughness, influenced by the disposition of the nanoparticles on MBA monolayer. Sensor platform interaction to *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *Candida tropicalis* is shown in Fig. 2c-f. Noticeable changes in roughness and peaks confirm the biointeraction between sensor-microorganism. Most images reveal microbial membrane debris resulting from the continuous interaction of the antimicrobial peptide with the surface of the evaluated bacteria and fungi [23].

CV and EIS were employed to characterize the assembling process of the AMP-based biosensor. Fig. 3a shows the CV plots obtained after deposition of each biosensor component. The redox probe revealed a reversible behavior of redox peaks in the cleaned BGE (Fig. 3a). A decrease in the peak currents was observed after 4-MBA adsorption (Fig. 3a). An increase in peak current was obtained after immobilization

of Fe₃O₄-Chit-SynoecaMP (Fig. 3a), probably due to activating the negatively charged terminal carboxylic groups (-COOH) of 4-MBA then substituted by intermediate NHS-esters, leading to a slightly positively charged electrode surface [29]. In addition, magnetic nanoparticles are characterized by enhancing electron exchanges, favoring the electrochemical response [30].

A typical impedimetric spectrum for the cleaned BGE is shown in Fig. S2b (curve A), where a small semicircle indicates an unhindered electron transfer ($R_{CT} = 0.109 \text{ k}\Omega \pm 0.087$). The functionalization of the working electrode with 4-MBA monolayer (Fig. 3b) blocks the electron transfer. This event results in a significant increase in resistance ($R_{CT} = 1.42 \text{ k}\Omega \pm 0.15$). Moreover, 4-MBA benzene ring promotes an enhanced electron transfer, improving the electrochemical response of the biosensor [31]. A decrease in the semicircle diameter was obtained ($R_{CT} = 0.352 \text{ k}\Omega \pm 0.23$) after immobilizing the Fe₃O₄-Chit-SynoecaMP (Fig. 3b). In addition, the relative conductivity of the nanoparticles and NHS-ester favored electron transfer, and the Fe(CN)₆^{3-/4-} redox couple quickly reached the electrode interface [32].

Structural singularities in the cell wall of fungi and bacteria can promote specific interaction with the peptide anchored in the biosensor. The interaction between AMPs and microorganisms is typically mediated by electrostatic interactions and subsequently inserting the amphipathic structure in the membrane [7]. Synoeca-MP interaction with microbial targets results in AMP/microorganism complexes associated with a reducing the electron transfer rate. In addition, the electrical response intensity is proportional to the number of microorganisms present in the solution in terms of CFU mL⁻¹ [33].

3.2. Electrochemical characterization for the detection of pathogenic targets

The biosensor was tested against increasing concentrations of target microorganisms (10¹ to 10⁵ CFU mL⁻¹), suspended in PBS 10 mM (pH 7), incubated for 5 min, and rinsed to remove unbound cells. Fig. S1 a-d shows the biorecognition process measured through CV analyses. CV plots revealed a decrease in both oxidation and reduction peaks according to the increasing concentration of the microorganisms. The linear relationship between the changes in electrical current and the bacteria/fungi concentrations (inset Fig. S1 a-d) stands out the biosensor sensitivity with a limit of detection of 10 CFU mL⁻¹. The anodic current variation (ΔI) was assessed [34] using the following equation:

$$\Delta I (\%) = \frac{(I_b - I_a)}{I_b} \times 100$$

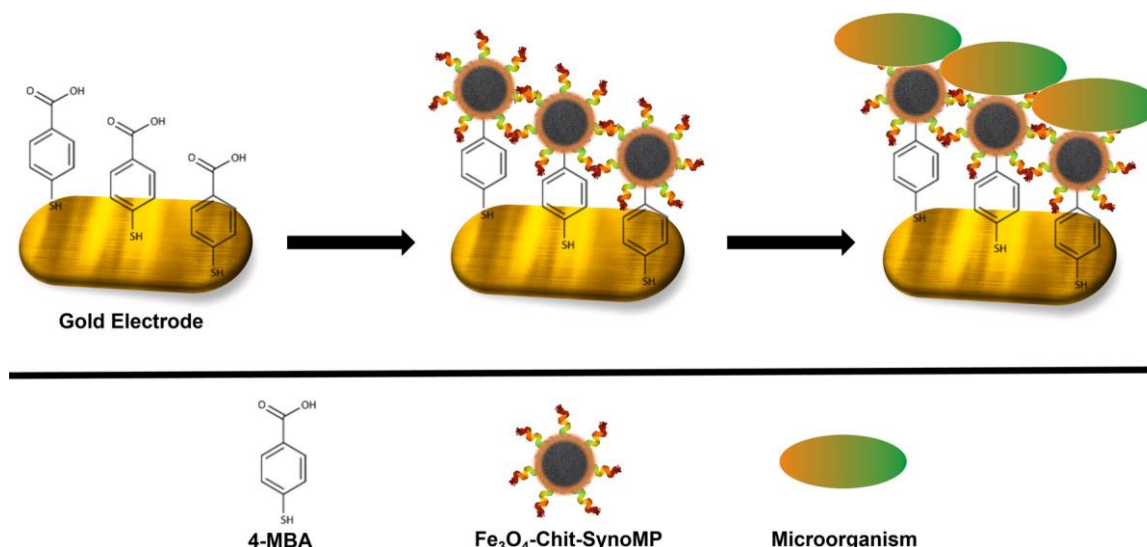


Fig. 1. Schematic representation for the assembly of the proposed biosensor platform.

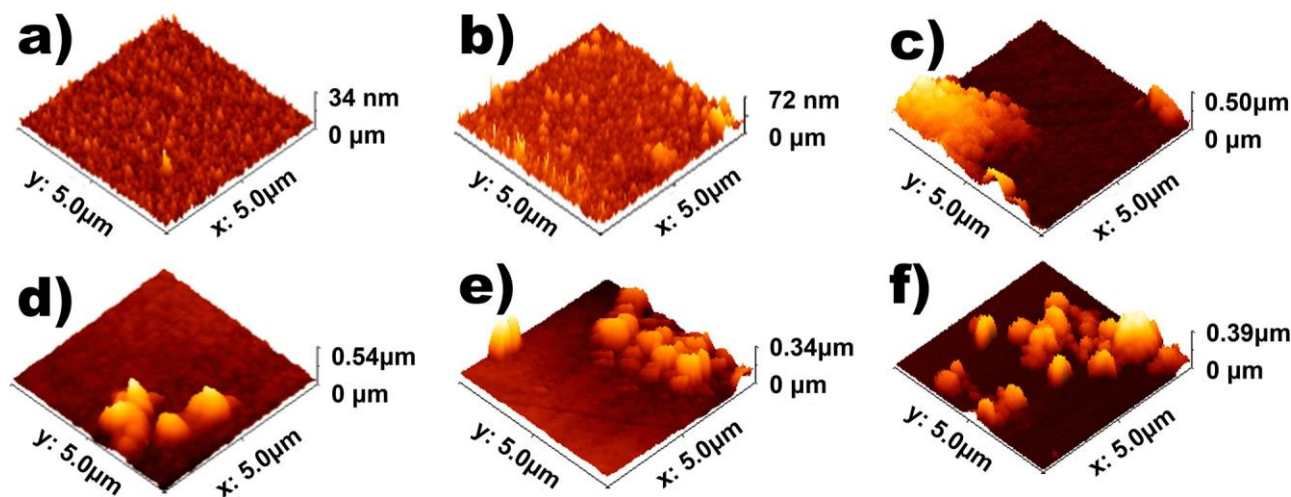


Fig. 2. AFM topographic images ($5.0 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$) of the biosensor before and after microorganism interaction: 4-MBA (a), Fe_3O_4 -Chit-SynoecaMP (b), *K. pneumoniae* (c), *P. aeruginosa* (d), *E. faecalis* (e), and *C. tropicalis* (f).

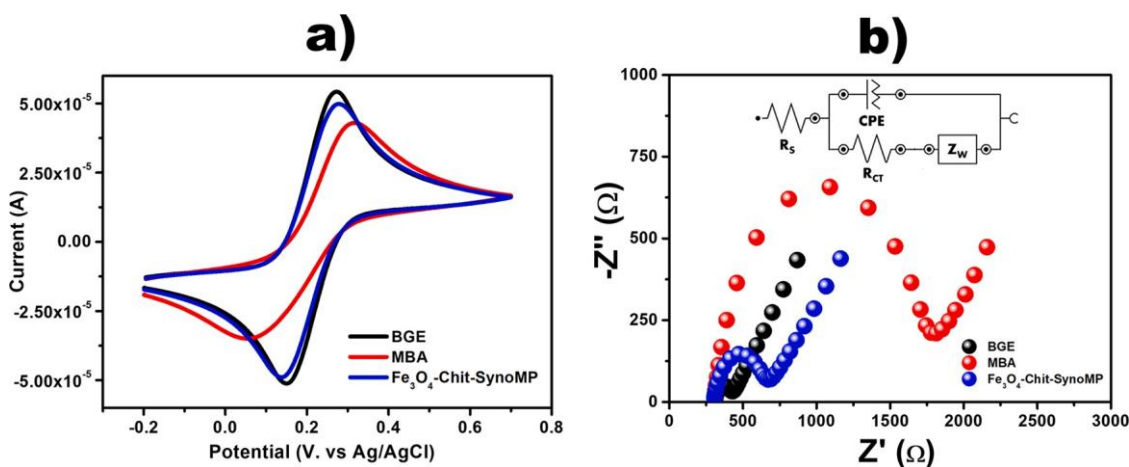


Fig. 3. (a) Cyclic voltammogram (a) and Nyquist plot (b) for the stepwise assembly process.

where I_a corresponds to the anodic peak current obtained after bacterial/fungal biorecognition and I_b is the anodic peak current values for the MBA- Fe_3O_4 -Chit-SynoecaMP sensing layer. Table S1 shows the results of ΔI for sensor platform after interaction with different concentrations of microorganisms. A gradual increase in ΔI values was noticed following the increase of bacteria and fungi concentration.

The assembly of a sensing layer to study electrode-electrolyte interfaces through EIS brings a new perspective to microbiological diagnostic methods. EIS was used to access the electrical response given by the Synoeca-MP biosensor after interaction with bacterial and fungal species. These interactions occurred by the strong affinity of the negatively charged microbial outer membrane and the cationic peptide [15]. The evidence obtained through these experiments provides valuable information based on the charge transfer reactions after biosensor/analyte interaction, thus allowing the discrimination between species [35].

Faradaic impedance measurements are shown in Fig. 4a-d. The binding ability of the AMP as sensing elements was verified through the Nyquist impedance plots after incubation of an increasing concentration of microorganisms. It is worth mentioning that the variation of the semicircle located in high-frequency domains brings essential information about the detected analyte [36]. This specific interaction resulted in different patterns of the semicircles and R_{CT} values.

Synoeca-MP biosensor system reveals more significant electrical responses for Gram-negative bacteria (Fig. 4a-b). The following electrical response sequence was obtained: *K. pneumoniae* > *P. aeruginosa* > *C. tropicalis* > *E. faecalis*. These results indicate that the affinity of the Synoeca-MP peptide is higher to Gram-negative species, leading to an increased interfacial resistivity of the electrode. Other authors [26,37] reported similar results in electrochemical AMP-based biosensors.

A modified Randles' equivalent circuit (inset Fig. 2b) was chosen to fit the impedance results. This circuit comprises the ohmic resistance of the solution (R_s) inserted as a series element and parallel to the constant phase element (CPE), charge transfer resistance (R_{CT}), and the Warburg impedance (Z_W). R_s and Z_W express the diffusion processes of the redox pair. CPE and R_{CT} are associated with changes in the electrochemical interface between the modified electrode and supporting electrolyte. Thus, these changes express the behavior of the electrical double layer for a non-homogeneous surface and the insulating features occurring in the same interface [38]. In this sense, R_{CT} is as the main parameter to evaluate the events occurring on the electrode interface.

The obtained values of the Randles' circuit elements after detecting bacteria and fungi are shown in Table 1. The sensing platform exhibited a linear relationship between the R_{CT} variation and bacterial/fungal concentration for all microorganisms, as observed in the correlation coefficient values inset Fig. 4a-d.

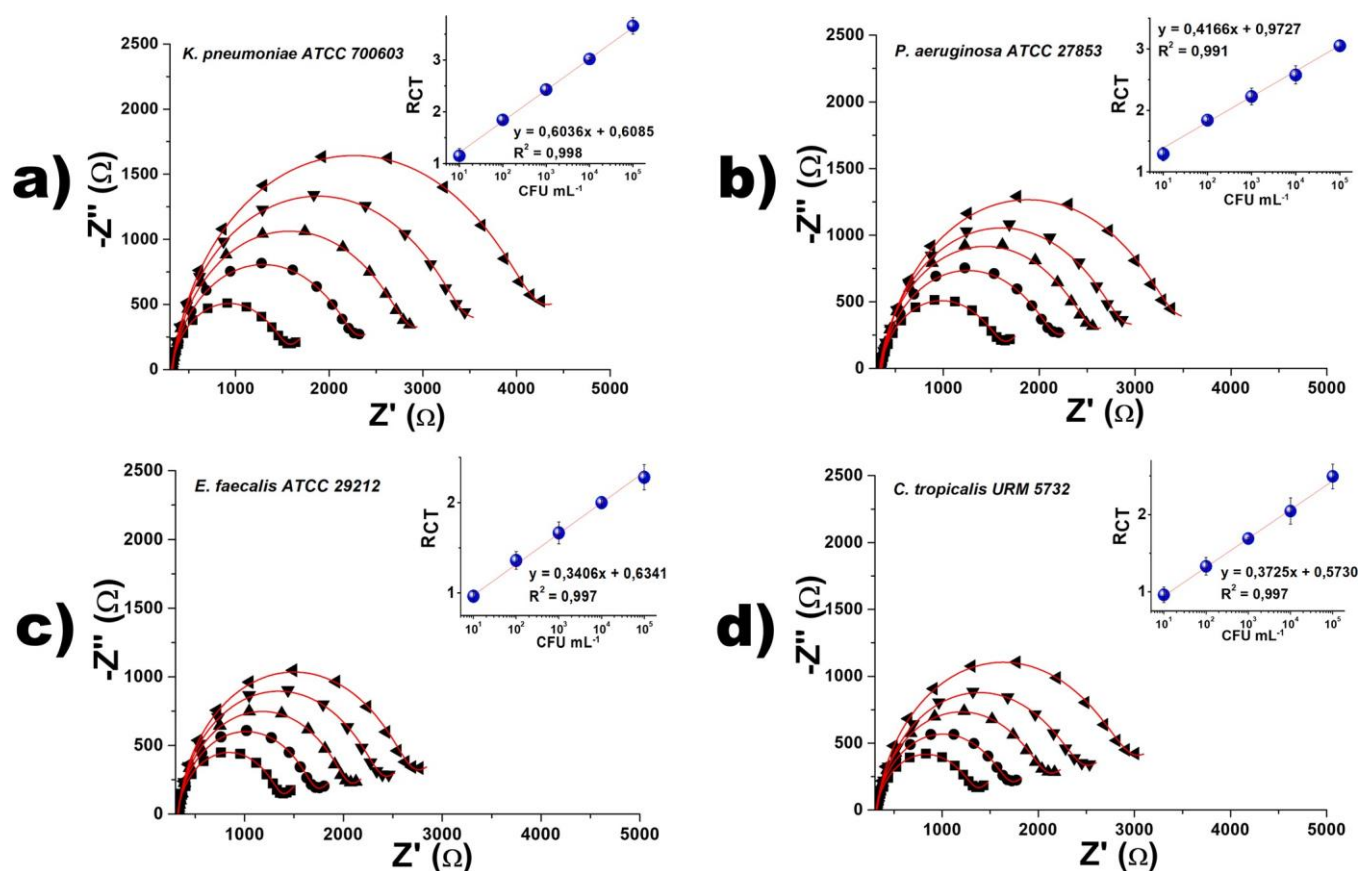


Fig. 4. Nyquist plots of the SynoeCaMP-functionalized sensor after exposure to different concentrations of *K. pneumoniae* (a), *P. aeruginosa* (b), *E. faecalis* (c), and *C. tropicalis* (d). Symbols represent the microbial concentration in terms of CFU mL^{-1} : (■) 10^1 CFU, (●) 10^2 CFU, (▲) 10^3 CFU, (▼) 10^4 CFU, (◆) 10^5 CFU. Inset: calibration curve.

3.3. Selectivity of the biosensor

CV and EIS analyses indicate that the biosensor identified multiple microbial species with enhanced sensitivity. The limit of detection (LOD) of the proposed biosensor was 10 CFU mL^{-1} .

AMPs have attracted attention to the biosensor area due to their ability to bind to microorganisms [17]. AMP's properties vary according to the amino acid sequence [16]. AMPs present a poly-cationic surface associated with their amphiphilic conformation to interact with the microbial cell outer membrane. Once the microbial surface gives an inherent anionic nature, initial electrostatic interaction with AMPs occurs. The interaction mechanism with Gram-negative species is associated with negatively charged lipopolysaccharide (LPS). Gram-positive bacteria offer an electronegative surface charge due to the lipoteichoic acid (LTA) content [16,39]. In addition, the negatively charged surface of fungi is associated to phosphomannans or analogous constituents [40]. AMPs are promising biodegradation tools for presenting easiness in handling, synthesis, and stability in multiple chemical conditions [41]. The formation of AMP-microorganism complexes leads to an increased impedimetric response due to the resulting blocking effect of the redox pair to the electrode interface.

Literature reports the use of AMPs for bacterial [34] and fungal [42] identification. Although the interaction with yeast cells and the antifungal mechanism of AMP has not been fully elucidated, it is suggested to be like those observed in bacteria, where the permeabilization of the fungal membrane could disturb the integrity of the lipid content [43]. However, these peptides' increased production of reactive oxygen species by penetrating the membrane bilayer or interacting with β -1, 3-glucan, an abundant polysaccharide in the fungal cell wall, may also lead to an apoptotic process [44]. Compared with peptides in a soluble

state, peptides immobilized on surfaces such as the one addressed in the present study can result in reduced mobility, leading to a limited transposition of the microbial cell wall without losing structural integrity [17]. Therefore, due to limited studies comparing the mechanisms of action of immobilized and soluble peptides, especially in the evaluation of the AMP-microorganism interaction, it is difficult to assume the differences in the behavior of the peptide with the microbial target. Thus, we used the electrochemical approach to evaluate this interaction, using the 5-minute AMP-microorganism interaction time to avoid possible loss of cellular structural integrity. The results revealed greater impedimetric response for Gram-negative species, probably due to a greater electrostatic interaction with the polycationic peptide SynoeCaMP. In addition, aiming for the integrity of cells attached to the sensing surface, 5-minute incubation was fast enough to avoid membrane rupture and apoptosis. Studies suggest incubation of the peptide with microorganisms for 24 h to result in membrane rupture and cell death [15,45].

Some authors developed different biosensors based on AMPs for whole-cell microbial detection. Islam et al. [46] and Etayash et al. [47] proposed the use of the antimicrobial peptides warnericin RK (warn-RK) and leucocin A (leuc-A) for the detection of different bacterial species, where both biosensors presented a LOD of 10^3 CFU mL^{-1} . Our study showed a sensitivity of a LOD = 10 CFU mL^{-1} . The proposed biosensor shows the capability to differentiate four pathogenic bacteria species (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, and *E. faecalis*) and a yeast species (*C. tropicalis*). A summary comparing the biosensor to others AMP-based biosensors is shown in Table 2.

The performance of the biosensor was evaluated through the relative variation of R_{CT} (ΔR_{CT}), according to the following equation [48]:

Table 1

Data of the equivalent circuit elements obtained from fitted impedance results.

Modified Electrode	CFU mL ⁻¹	R _{CT} (kΩ)	CPE (μF)	R _s	W
Synoeca-MP Biosensor	–	0.352	1.21	0.303	0.833
	10 ¹	± 0.23 1.54	± 0.087 0.991	± 0.012 0.322	± 0.061 0.781
	10 ²	± 0.11 2.67	± 0.034 0.814	± 0.011 0.320	± 0.025 0.737
<i>K. pneumoniae</i>	10 ³	± 0.17 3.65	± 0.035 0.779	± 0.013 0.332	± 0.022 0.710
	10 ⁴	± 0.14 4.50	± 0.041 0.758	± 0.012 0.326	± 0.036 0.695
	10 ⁵	± 0.23 5.12	± 0.039 0.747	± 0.015 0.316	± 0.037 0.722
	10 ¹	± 0.09 1.22	± 0.034 1.17	± 0.016 0.346	± 0.041 0.658
	10 ²	± 0.13 1.76	± 0.022 1.09	± 0.009 0.346	± 0.015 0.676
<i>P. aeruginosa</i>	10 ³	± 0.06 2.13	± 0.015 0.955	± 0.010 0.336	± 0.021 0.634
	10 ⁴	± 0.12 2.45	± 0.028 0.930	± 0.008 0.345	± 0.022 0.624
	10 ⁵	± 0.08 2.97	± 0.018 0.944	± 0.012 0.359	± 0.019 0.600
	10 ¹	± 0.21 0.996	± 0.015 1.24	± 0.014 0.314	± 0.023 0.740
	10 ²	± 0.125 1.34	± 0.014 1.05	± 0.012 0.313	± 0.049 0.674
<i>C. tropicalis</i>	10 ³	± 0.08 1.68	± 0.027 0.911	± 0.008 0.313	± 0.052 0.554
	10 ⁴	± 0.14 2.05	± 0.035 0.871	± 0.009 0.324	± 0.043 0.488
	10 ⁵	± 0.15 2.53	± 0.031 0.818	± 0.014 0.319	± 0.058 0.466
	10 ¹	± 0.10 0.598	± 0.035 1.24	± 0.011 0.300	± 0.044 0.660
	10 ²	± 0.084 0.811	± 0.012 1.16	± 0.010 0.317	± 0.041 0.648
<i>E. faecalis</i>	10 ³	± 0.096 0.962	± 0.033 1.03	± 0.006 0.300	± 0.028 0.671
	10 ⁴	± 0.107 1.21	± 0.026 0.984	± 0.011 0.305	± 0.030 0.667
	10 ⁵	± 0.022 1.49	± 0.015 0.986	± 0.009 0.315	± 0.034 0.662
		± 0.091	± 0.022	± 0.012	± 0.027

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT}(\text{microorg}) - R_{CT}(\text{sensor})}{R_{CT}(\text{sensor})} \times 100$$

R_{CT} (microorg) comprises R_{CT} values for the modified electrode after bacterial/fungal biorecognition, and R_{CT} (sensor) is the R_{CT} values for the AMP sensing layer. As observed in Fig. 5a, we found a linear relationship between the ΔR_{CT} and the microorganism concentration. After bacterial and fungal binding, distinct electrical current changes were observed due to massive hindering of the electron transfer after forming AMP-target complexes at the electrode interface. These different microbial identification patterns occurred possibly due to structural features. Higher ΔR_{CT} values were obtained for Gram-negative species

Table 2

Comparison of the analytical performance of the SynoecaMP biosensor platform with other biosensor strategies.

Antimicrobial peptide	Microorganism	Transducer	Limit of detection (CFU mL ⁻¹)	Reference
Warnericin RK	<i>L. pneumophila</i>	Fluorescence Microscopy	10 ³ CFU mL ⁻¹	[46]
hLF1-11	<i>Streptococcus sanguinis</i>	EIS	10 ¹ CFU mL ⁻¹	[51]
Magainin I	<i>E. coli</i> O157:H7	Electrogenenerated chemiluminescence and EIS	1.2 × 10 ² CFU mL ⁻¹	[52]
Clavanin A	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i>	CV and EIS	10 ¹ CFU mL ⁻¹	[34]
K-7α12	<i>E. coli</i>	Spectrometer (Interferometric Reflectance Spectra)	10 ³ CFU mL ⁻¹	[53]
Nisin	<i>Salmonella</i> spp.	EIS	1.5 × 10 ¹ CFU mL ⁻¹	[54]
Synoeca-MP	<i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. faecalis</i> <i>C. tropicalis</i>	CV and EIS	10 ¹ CFU mL ⁻¹	This work.

(*K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*).

The degree of surface coating (θ) of the sensing layer was evaluated [26], which is defined as:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT}(\text{biosensor})}{R_{CT}(\text{target})}$$

R_{CT} (biosensor) corresponds to the R_{CT} value of the MBA-Fe₃O₄-Chit-SynoecaMP platform, and R_{CT} (target) is the charge transfer resistance value acquired after interaction with bacterial and fungal cells. Indeed, these values provide additional information about identifying the microorganisms through percent coverage of the functionalized working electrode. Fig. 5b shows a plot of θ as a function of an increasing microbial concentration (10¹-10⁵ CFU mL⁻¹) bounded to the Synoeca-MP-modified biosensor. As expected, θ values increase proportionally to the increase of CFU. At 10³ CFU mL⁻¹, θ was found to be ~0.87 (87%) and ~0.85 (85%) for *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, respectively. The biosensor preferentially binds to Gram-negative bacteria, especially *K. pneumoniae*. It is supposed that occur due to the capsular polysaccharide. The carboxyl groups of the galacturonic acid residues provide an electronegative charge [49,50].

4. Conclusions

Synoeca-MP was successfully integrated in a biosensing assembly based in chitosan-capped magnetic nanoparticles (Fe₃O₄-Chit). The biointeraction activity of Synoeca-MP was assessed by measuring the changes of anodic and cathodic peak currents and impedimetric measurements analyzed through the Nyquist plot. The values of the R_{CT} element presented variation after the interaction with the microbial strains thus implying the formation of SynoecaMP-target complexes. Detection was accomplished for *Enterococcus faecalis* (G₊), *Klebsiella pneumoniae* (G₋), *Pseudomonas aeruginosa* (G₋), and *Candida tropicalis* in a recognition range from 10¹ to 10⁵ CFU.mL⁻¹ with an instrumental limit of detection of 10 CFU.mL⁻¹ for each specimen. However, the device presented a preferential selectivity towards Gram-negative bacteria. For the most probable, Gram-positive, and fungal cell wall components were differentiated by their poor electronegative surface, characterized by the presence of lipoteichoic acid and phosphomannans, respectively. The developed biosensor is envisaged for environmental monitoring applications as a straightforward tool to detect microorganisms in a sensitive and fast way in aqueous samples.

CRediT authorship contribution statement

Alberto G. da Silva Junior: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Isaac A. M. Frias:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Reginaldo G. Lima-Neto:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Octávio L. Franco:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Maria D.L. Oliveira:** Methodology, Investigation, Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. **César A.S. Andrade:** Conceptualization,

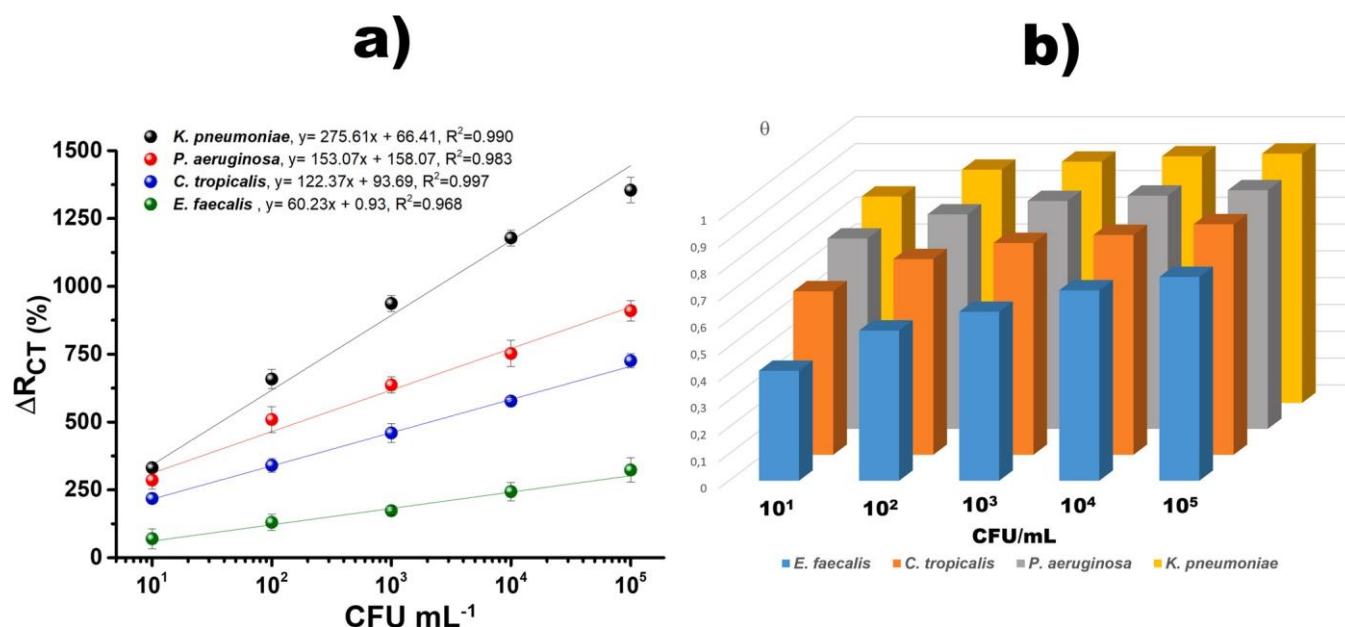


Fig. 5. (a) ΔR_{CT} (%) and (b) degree of surface coverage (θ) of the SynoecaMP biosensor exposed to samples of bacteria/fungi strains at different concentrations.

Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 314894/2018-7, 314756/2018-3 and 435059/2018-1), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Science and Technology Support Foundation of Pernambuco State/FACEPE (BCT-0056-2.09/18). Isaac A. M. Frías would like to thank CAPES and FACEPE for the postdoctoral fellowship (APQ-0437-4.03/17). Alberto G. Silva Júnior would like to thank CAPES for the PhD scholarship. We acknowledge Dr. Sandra R. Sá for her helpful assistance with the bacteria samples. This work was also supported by FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul), FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.enzmictec.2022.110088](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110088).

References

- G. Cissé, Food-borne and water-borne diseases under climate change in low- and middle-income countries: further efforts needed for reducing environmental health exposure risks, *Acta Trop.* 194 (2019) 181–188, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.012>.
- F.S. Alhamlan, A.A. Al-Qahtani, M.N. Al-Ahdal, Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries, *J. Infect. Dev. Ctries.* 9 (2015) 128–135, <https://doi.org/10.3855/jidc.6101>.
- T.E. Dobbs, A.Y. Guh, P. Oakes, M.J. Vince, J.C. Forbi, B. Jensen, H. Moulton-Meissner, P. Byers, Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections at an outpatient chemotherapy center, *Am. J. Infect. Control.* 42 (2014) 731–734, <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.03.007>.
- L. Shokoozhadeh, A. Ekrami, M. Labibzadeh, L. Ali, S.M. Alavi, Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of enterococci isolates in hospitalized burn patients, *BMC Res. Notes* 11 (2018) 5–9, <https://doi.org/10.1186/s13104-017-3088-5>.
- G. Quindós, Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face, *Rev. Iberoam. Micol.* 31 (2014) 42–48, <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.001>.
- A. Ahmed, J.V. Rushworth, N.A. Hirst, P.A. Millner, Biosensors for whole-cell bacterial detection, *Clin. Microbiol. Rev.* 27 (2014) 631–646, <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13>.
- M. Hoyos-Nogués, F.J. Gil, C. Mas-Moruno, Antimicrobial peptides: powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies, *Molecules* 23 (2018) 1–24, <https://doi.org/10.3390/molecules23071683>.
- A. Mobed, B. Baradaran, M. de la Guardia, M. Agazadeh, M. Hasanazadeh, M. A. Rezaee, J. Mosafar, A. Mokhtarzadeh, M.R. Hamblin, Advances in detection of fastidious bacteria: from microscopic observation to molecular biosensors, *TrAC Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 157–171, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.012>.
- N.A. Parmin, U. Hashim, S.C.B. Gopinath, M.N.A. Uda, Biosensor recognizes the receptor molecules, in: *Nanobiosensors for Bio-molecular Targeting*, Elsevier Inc, 2019, pp. 195–210, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813900-4.00008-7>.
- M.W. Akram, M.F. Alam, H.N. Ji, A. Mahmood, T. Munir, M.Z. Iqbal, M.R. Saleem, N. Amin, A.G. Wu, Chitosan blend iron oxide nanostructure-based biosensor for healthy & malignant tissue glucose/urea detection, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 474 (2019), <https://doi.org/10.1088/1757-899X/474/1/012060>.
- G.H. Podrepšek, Ž. Knez, M. Leitgeb, Development of chitosan functionalized magnetic nanoparticles with bioactive compounds, *Nanomaterials* 10 (2020) 1–25, <https://doi.org/10.3390/nano10101913>.
- E. Katz, Synthesis, properties and applications of magnetic nanoparticles and nanowires—a brief introduction, *Magnetochemistry* 5 (2019) 61, <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5040061>.
- G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan, Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications, *Biosens. Bioelectron.* 103 (2018) 113–129, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031>.
- V. Nareish, N. Lee, A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors, *Sensors* 21 (2021) 1–35, <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- D.O. Freire, N.B. da Cunha, M.L. Leite, A.G.C. Kostopoulos, S.N.B. da Silva, A.C. B. de Souza, D.O. Nolasco, O.L. Franco, M.R. Mortari, S.C. Dias, Wasp venom peptide, synoeca-MP, from *Synoeca surinama* shows antimicrobial activity against human and animal pathogenic microorganisms, *Pept. Sci.* 112 (2020) 1–6, <https://doi.org/10.1002/pep2.24141>.
- J. Lei, L.C. Sun, S. Huang, C. Zhu, P. Li, J. He, V. Mackey, D.H. Coy, Q.Y. He, The antimicrobial peptides and their potential clinical applications, *Am. J. Transl. Res.* 11 (2019) 3919–3931.
- Z. Qiao, Y. Fu, C. Lei, Y. Li, Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: a review, *Food Control* 112 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107116>.

- [18] CLSI, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard, 3th ed., Clin. Lab. Stand. Inst., 2008, pp. 0–13. https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf.
- [19] CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Tenth ed., Clin. Lab. Standards Inst., 2015, p. 15.
- [20] S. Sutton, Measurement of microbial cells by optical density, *J. Valid. Technol.* 17 (2011) 46–49. http://www.microbiologynetwork.com/content/JVT_2011_v17n1_Measurement-of-Microbial-Cells-by-Optical-Density.pdf.
- [21] W. Wang, H. Jiang, G. Liu, Q. Chen, C. Mei, K. Li, Y. Huang, Quantitative analysis of yeast growth process based on FT-NIR spectroscopy integrated with Gaussian mixture regression, *RSC Adv.* 7 (2017) 24988–24994, <https://doi.org/10.1039/c7ra02774e>.
- [22] A.G. da Silva, I.A.M. Frias, R.G. Lima-Neto, L. Migliolo, P.S. e Silva, M.D. L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Electrochemical biosensor based on temporin-Pta peptide for detection of microorganisms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2022), 114788, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114788>.
- [23] K.L. Ribeiro, I.A.M. Frias, A.G. Silva, R.G. Lima-Neto, S.R. Sá, O.L. Franco, M.D. L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Impedimetric clavam peptide-based sensor differentiates ploidy of candida species, *Biochem. Eng. J.* 167 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107918>.
- [24] S.M. Asiri, F.A. Khan, A. Bozkurt, Synthesis of chitosan nanoparticles, chitosan-bulk, chitosan nanoparticles conjugated with glutaraldehyde with strong anti-cancer proliferative capabilities, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46 (2018) S1152–S1161, <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1533846>.
- [25] Y. Zhou, Y. Fang, R.P. Ramasamy, Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development, *Sensors* 19 (2019), <https://doi.org/10.3390/s19020392>.
- [26] 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, *Coll. Surf. B Biointerfaces* 135 (2015) 833–839, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.037>.
- [27] Y. Ram, T. Yoetz-Kopelman, Y. Dror, A. Freeman, Y. Shacham-Diamand, Impact of molecular surface charge on biosensing by electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochim. Acta* 200 (2016) 161–167, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.162>.
- [28] G. Castillo, K. Spinella, A. Poturnayová, M. Šnejdárková, L. Mosiello, T. Hianik, Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform, *Food Control* 52 (2015) 9–18, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.008>.
- [29] H. Vaisocherová, W. Yang, Z. Zhang, Z. Cao, G. Cheng, M. Piliarik, J. Homola, S. Jiang, Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7894–7901, <https://doi.org/10.1021/ac8015888>.
- [30] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. de la Guardia, Iron and iron-oxide magnetic nanoparticles as signal-amplification elements in electrochemical biosensing, *TrAC Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.016>.
- [31] 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-mercapto-benzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers, *Sens. Actuators B Chem.* 220 (2015) 565–572, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.067>.
- [32] R. Saxena, S. Srivastava, An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit, *Sens. Actuators B Chem.* 297 (2019), 126780, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126780>.
- [33] D. Albanese, F. Garofalo, R. Pilloton, S. Capo, F. Malvano, Development of an antimicrobial peptide-based biosensor for the monitoring of bacterial contaminations, *Chem. Eng. Trans.* 75 (2019) 61–66, <https://doi.org/10.3303/CET1975011>.
- [34] J.L. de Miranda, M.D.L. Oliveira, I.S. Oliveira, I.A.M. Frias, O.L. Franco, C.A. S. Andrade, A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection, *Biochem. Eng. J.* 124 (2017) 108–114, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.013>.
- [35] M. Grossi, B. Riccò, Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review, *J. Sens. Sens. Syst.* 6 (2017) 303–325, <https://doi.org/10.5194/jsss-6-303-2017>.
- [36] M.E. Strong, J.R. Richards, M. Torres, C.M. Beck, J.T. La Belle, Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics, *Biosens. Bioelectron.* 177 (2021), 112949, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112949>.
- [37] A.G. Silva Junior, M.D.L. Oliveira, I.S. Oliveira, R.G. Lima-Neto, S.R. Sá, O. L. Franco, C.A.S. Andrade, A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin A peptide for bacterial detection, *Sens. Actuators B Chem.* 255 (2018) 3267–3274, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.153>.
- [38] A. Chakraborty, D.N. Tibarewala, A. Barui, Impedance-Based Biosensors, Elsevier Ltd, 2019, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102420-1.00005-4>.
- [39] N. Malanovic, K. Lohner, Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1858 (2016) 936–946, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>.
- [40] J.I. Ibeas, H. Lee, B. Damsz, D.T. Prasad, J.M. Pardo, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, M.L. Narasimhan, Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein, *Plant J.* 23 (2000) 375–383, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2000.00792.x>.
- [41] É. Pardoux, A. Roux, R. Mathey, D. Boturyn, Y. Roupiez, Antimicrobial peptide arrays for wide spectrum sensing of pathogenic bacteria, *Talanta* 203 (2019) 322–327, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.062>.
- [42] M.M. Welling, A. Lupetti, H.S. Balter, S. Lanzzeri, B. Souto, A.M. Rey, E.O. Savio, A. Paulusma-Annema, E.K.J. Pauwels, P.H. Nibbering, 99mTc-labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and Candida albicans infections, *J. Nucl. Med.* 42 (2001) 788–794.
- [43] J. Cho, D.G. Lee, Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in Candida albicans, *Biochimie* 93 (2011) 1873–1879, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.07.011>.
- [44] K. Wang, W. Dang, J. Xie, R. Zhu, M. Sun, F. Jia, Y. Zhao, X. An, S. Qiu, X. Li, Z. Ma, W. Yan, R. Wang, Antimicrobial peptide protonectin disturbs the membrane integrity and induces ROS production in yeast cells, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1848 (2015) 2365–2373, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.07.008>.
- [45] E.M.G.L. Dantas, S.M.F. Lima, A.P.C. Cantuária, I.A. Amorim, J.A. Almeida, T. F. Cunha, O.L. Franco, T.M.B. Rezende, Synergistic activity of chlorhexidine and synoca-MP peptide against Pseudomonas aeruginosa, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 16068–16079, <https://doi.org/10.1002/jcp.28265>.
- [46] M.A. Islam, W.M. Hassen, A.F. Tayabali, J.J. Dubowski, Antimicrobial warnericin RK peptide functionalized GaAs/AlGaAs biosensor for highly sensitive and selective detection of Legionella pneumophila, *Biochem. Eng. J.* 154 (2020), 17435, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107435>.
- [47] 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, <https://doi.org/10.1021/ac4034938>.
- [48] J.M. Lim, M.Y. Ryu, J.H. Kim, C.H. Cho, T.J. Park, J.P. Park, An electrochemical biosensor for detection of the sepsis-related biomarker procalcitonin, *RSC Adv.* 7 (2017) 36562–36565, <https://doi.org/10.1039/c7ra06553a>.
- [49] S. Fresno, N. Jiménez, L. Izquierdo, S. Merino, M.M. Corsaro, C. De Castro, M. Parrilli, T. Naldi, M. Requé, J.M. Tomás, The ionic interaction of Klebsiella pneumoniae K2 capsule and core lipopolysaccharide, *Microbiology* 152 (2006) 1807–1818, <https://doi.org/10.1099/mic.0.28611-0>.
- [50] C. Opoku-Temeng, S.D. Kobayashi, F.R. DeLeo, Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17 (2019) 1360–1366, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.09.011>.
- [51] M. Hoyos-Nogués, S. Brosel-Oliu, N. Abramova, F.X. Muñoz, A. Bratov, C. Mas-Moruno, F.J. Gil, Impedimetric antimicrobial peptide-based sensor for the early detection of periodontopathogenic bacteria, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 377–385, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.066>.
- [52] Z. Li, H. Yang, L. Sun, H. Qi, Q. Gao, C. Zhang, Electrogenated chemiluminescence biosensors for the detection of pathogenic bacteria using antimicrobial peptides as capture/signal probes, *Sens. Actuators B Chem.* 210 (2015) 468–474, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.011>.
- [53] E. Tenenbaum, E. Segal, Optical biosensors for bacteria detection by a peptidomimetic antimicrobial compound, *Analyst* 140 (2015) 7726–7733, <https://doi.org/10.1039/c5an01717c>.
- [54] F. Malvano, R. Pilloton, D. Albanese, A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide nisin for the detection of Salmonella spp, *Food Chem.* 325 (2020), 126868, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126868>.

APÊNDICE F – ARTIGO 3

**“ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON TEMPORIN-PTA PEPTIDE FOR
DETECTION OF MICROORGANISMS”**



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.journals.elsevier.com/journal-of-pharmaceutical-and-biomedical-analysis

Electrochemical biosensor based on Temporin-PTA peptide for detection of microorganisms

Alberto G. da Silva-Junio^{a,b}, Isaac A.M. Frias^{a,b}, Reginaldo G. Lima-Neto^c, Ludovico Migliolo^d, Patrícia S. e Silva^d, Maria D.L. Oliveira^{a,b}, César A.S. Andrade^{a,b,*}^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil^b Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil^c Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil^d S-Inova Biotech, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, 79117-900 Campo Grande, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Biosensor

Magnetic nanoparticles

Bacteria

Candida

Temporin-PTA

Electrochemistry

ABSTRACT

Bacterial and fungal infections are challenging due to their low susceptibility and resistance to antimicrobial drugs. For this reason, antimicrobial peptides (AMP) emerge as excellent alternatives to overcome these problems. At the same time, their active insertion into the cell wall of microorganisms can be availed for bio-recognition applications in biosensing platforms. Temporin-PTA (T-PTA) is an AMP found in the skin secretions of the Malaysian fire frog *Hylarana picturata*, which presents antibacterial activity against MRSA, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis*. In this work, T-PTA was explored as an innovative sensing layer aiming for the electrochemical differentiation of *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and *C. tropicalis* based on the structural differences of their membranes. The biosensor was analyzed through electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). In this approach, the different structural features of each microorganism resulted in different adherence degrees and, therefore, different electrochemical responses. The transducing layer was fabricated by the self-assembling of a 4-mercaptobenzoic acid (MBA) monolayer and gold-capped magnetic nanoparticles (Fe₃O₄@Au) implemented to improve the electrical signal of the biointeraction. We found that each interaction, expressed in variations of electron transfer resistance and anodic peak current, demonstrated a singular response from which the platform can discriminate all different microorganisms. We found expressive sensitivity towards Gram-negative species, especially *K. pneumoniae*. A detection limit of 10¹ CFU.mL⁻¹ and a linear range of 10¹ to 10⁵ CFU.mL⁻¹ were obtained. The T-PTA biosensor platform is a promising and effective tool for microbial identification

1. Introduction

Increasing bacterial and fungal infection cases by drug-resistant microorganisms is an alarming problem. ESKAPE is an acronym for a series of well-known pathogens mainly found in hospital-acquired infections related to contaminated invasive devices [1], including *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter*. Other food poisoning pathogens such as *Enterococcus faecalis* and some *Bacillus* species have earned special attention. Additionally, immunocompromised patients are at risk in several medical scenarios due to infections led by fungi species, especially *C. albicans* [2].

Gold standard techniques used for bacterial and fungal identification

are time-consuming, requiring more than 24 h to reach total growth in a culture media. These tests require several steps such as pre-enrichment, selective growth in differential broths, and biochemical screening, ending with serological confirmation through ELISA assay [3]. Molecular methods applied to identify microbial pathogens established through polymerase chain reaction (PCR) offer high specificity and accuracy. However, amplification of non-viable microbial cells can lead to false-positive results. Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a valuable technique for accurately identifying microorganisms. However, the high cost of the equipment, laborious analysis, and limited spectrum, in addition to the structural similarities of several microbial species, require its use followed by procedures already used in clinical medicine [4].

* Correspondence to: Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: csrandrade@gmail.com (C.A.S. Andrade).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114788>

Received 4 February 2022; Received in revised form 17 April 2022; Accepted 19 April 2022

Available online 22 April 2022

0731-7085/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Biosensor technology is in continuous progress; this multidisciplinary market was valued over USD 25 billion last year and is expected to reach USD 37 billion by 2026 [5]. The association of nanotechnology with biosensors increases sensibility since nanoparticles improve electrochemical reactions and provide signal amplification [6]. Iron oxide magnetic nanoparticles accelerate the signal transduction due to their high surface-to-volume area and electron-conducting. The coating of these nanoparticles by other metals improves their performance in biomolecule immobilization. Thus, favoring their application in therapeutics, imaging, and biological sensing area.

The expanding list of recognition elements to identify microbial targets increases biosensing platforms' ability to detect multiple analytes. Enzymes, antibodies, proteins, peptides, etc., are biorecognition probes reported for microbial detection [7]. The use of antimicrobial peptides (AMPs) as biorecognition probes attracts attention after being appreciated as an efficient tool against bacterial resistance. Such molecules are short-lengthed, consisting of up to 50 amino acids and remarkable cationic surface. These are valuable features for microbial sensors due to electrostatic interactions with the negatively charged surface of microorganisms, where the AMP adopt amphipathic helical structure leads to cell death [8]. Temporin-PTA (T-PTA), amino acid sequence FFGSVLKILIPKIL-NH₂, which presents antibacterial activity against MRSA, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* [9], can be synthesized through solid-phase peptide synthesis (SPPS) method. In previous reports, biosensors having AMPs as receptors are better analyzed through electrochemical impedance spectroscopy. AMP clavanin-MO has demonstrated biosensing success to differentiate ploidy of *Candida* species [10]. The peptide was immobilized onto a thin film of poly (3-thiophene acetic acid) to discriminate among four *Candida* species. Another AMP-based biosensor was reported by Malvano et al. [11], where Nisin was employed for the impedimetric detection of *Salmonella* sp., showing a limit of detection of 1.5×10^1 CFU.mL⁻¹.

This work integrated a self-assembled monolayer of 4-mercaptobenzoic acid (MBA) into the electrode to bind amine-functionalized gold-capped magnetic nanoparticles (Fe₃O₄@Au). Synthetic temporin-PTA (T-PTA) was used as a bacterial/ fungal biorecognition element. The stepwise assembly procedure of the biosensor was characterized using cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and atomic force microscopy (AFM). Six different microbial species were evaluated: *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *B. subtilis*, and *E. faecalis* as bacterial targets, while *C. albicans* and *C. tropicalis* were tested as fungal targets.

2. Experimental

2.1. Materials

Iron III chloride hexahydrate (FeCl₃·6H₂O), iron II sulfate heptahydrate (FeSO₄·7H₂O), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆]), potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]), 1-ethyl-3-(dimethyl aminopropyl)carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), sodium borohydride (NaBH₄), 4-mercaptobenzoic acid (MBA), and gold (III) chloride trihydrate (HAuCl₄·3H₂O) were obtained from Sigma Aldrich (USA). All other chemicals were of analytical grade and used without purification. In all experiments, ultrapure water (18.2 MΩ cm) obtained from Millipore Milli-Q (Billerica, USA) system was used.

The peptide T-PTA (NH₂-FFGSVLKILIPKIL-COOH) was synthesized by the solid-phase method using 9-fluorenyl-methoxycarbonyl chemistry purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography to > 98% purity on an acetonitrile/H₂O-TFA gradient and confirmed by ion-spray mass spectrometry by Aminothechem Company.

2.2. Microbial strains and culture media

Bacterial strains (*A. baumannii* UFPEDA 10248, *K. pneumoniae* ATCC

700603, *E. faecalis* ATCC 29212, and *B. subtilis* UFPEDA 86) were grown in nutrient agar. *Candida* strains (*C. albicans* ATCC 90028, and *C. tropicalis* URM 5732) were grown in Sabouraud dextrose agar. The growth occurred in the same experimental conditions, incubation at 35 °C for 24 h. Subsequently, two colonies were harvested, washed with sterilized saline solution (NaCl 0.9 g/L), centrifuged, suspended in sterile phosphate buffer saline (PBS) pH 7, and verified by MALDI-ToF MS (Bruker, Germany). All microorganisms were obtained from the Culture Collection of the Laboratory of Phytobacteriology of the Federal Rural University of Pernambuco (Brazil).

Freshly prepared bacterial and fungal suspensions were immediately evaluated in electrochemical studies. Microbial concentrations of 10¹-10⁵ colony forming units (CFU.mL⁻¹) were obtained according to the McFarland scale by UV-vis spectrophotometer (Genesys 10 S, Thermo Scientific), with an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) and absorbance adjusted to 0.08-0.1 and 590 nm for yeast with 90% transmittance. All microbial strains were acquired from the Department of Mycology (UFPEDA) of the Federal University of Pernambuco, Brazil.

2.3. Instrumentation and measurements

The sensing surface was characterized topographically through atomic force microscopy (AFM) using a commercial SPM-9700 microscope (Shimadzu Corporation, Japan) associated with Gwyddion software. The images (lateral resolution 515 × 512 pixels, scan area 10 × 10 μm) were obtained at 24 °C using cantilevers with silicon probe (spring constant 42 N.m⁻¹ and resonance frequency of 300 kHz) in a non-contact mode, evaluating at least three different areas in each sample.

Electrochemical characterization was carried out inside a Faraday cage with an Autolab potentiostat/galvanostat PGSTAT 128 N (Ecochemie, The Netherlands) using NOVA 1.11 software. A three-electrode system was used, with a gold disk electrode (ϕ = 2 mm) as the working electrode, platinum wire as an auxiliary electrode, and silver/silver chloride (saturated KCl 3 M) as a reference electrode.

CV analyses were recorded at the potential range between -0.2 V and 0.7 V with a scan rate of 50 mV s⁻¹. Impedance spectra were obtained in a frequency range between 100 mHz to 100 kHz with a 10 mV amplitude sine wave potential. As redox probe, 15 mL of 10 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ (1:1) solution were prepared in PBS 10 mM (pH 7). All measurements were run in triplicate at 24 °C ± 2 °C.

2.4. Synthesis and functionalization of gold-decorated magnetic nanoparticles

Fe₃O₄ nanoparticles were synthesized by the coprecipitation method of Fe²⁺ and Fe³⁺. Briefly, 8.5 mM FeCl₃·6H₂O and 4.5 mM FeSO₄·7H₂O were placed in a 100 mL beaker with 50 mL of deionized water and submitted to magnetic stirring at 65 °C for 1 h. Then, 5 mL of ammonium hydroxide (NH₄OH) were added dropwise into the previous solution and kept under vigorous stirring for 1 h at the same temperature. A blackish solution was immediately formed. Subsequently, after reaching 24 °C, the resulting Fe₃O₄ nanoparticles were separated under a magnetic field and washed several times with deionized water and ethanol until reaching pH 7, dried in an oven at 40 °C, and stored.

For gold decoration (Fe₃O₄@Au), Fe₃O₄ (100 mg) was dispersed in 50 mM HAuCl₄·3H₂O and placed under an ultrasonic bath for 1 h (37 °C ± 2 °C) and then stirred for 30 min, resulting in Au³⁺ seeded Fe₃O₄. Subsequently, as a reducing agent, D-glucose (0.1 M) was added to the suspension, followed by vigorous magnetic stirring for 1 h. Fe₃O₄@Au were collected, washed with deionized water three times, and dried in the air.

For the amination of Fe₃O₄@Au, 100 mg of the nanoparticles were dispersed in 200 mL of an ethanolic solution containing 13 mM of APTES, left under continuous stirring overnight. The amine-functionalized (Fe₃O₄@Au-NH₂) obtained were then washed with deionized water, ethanol and dried at 60 °C. The nanoparticles were

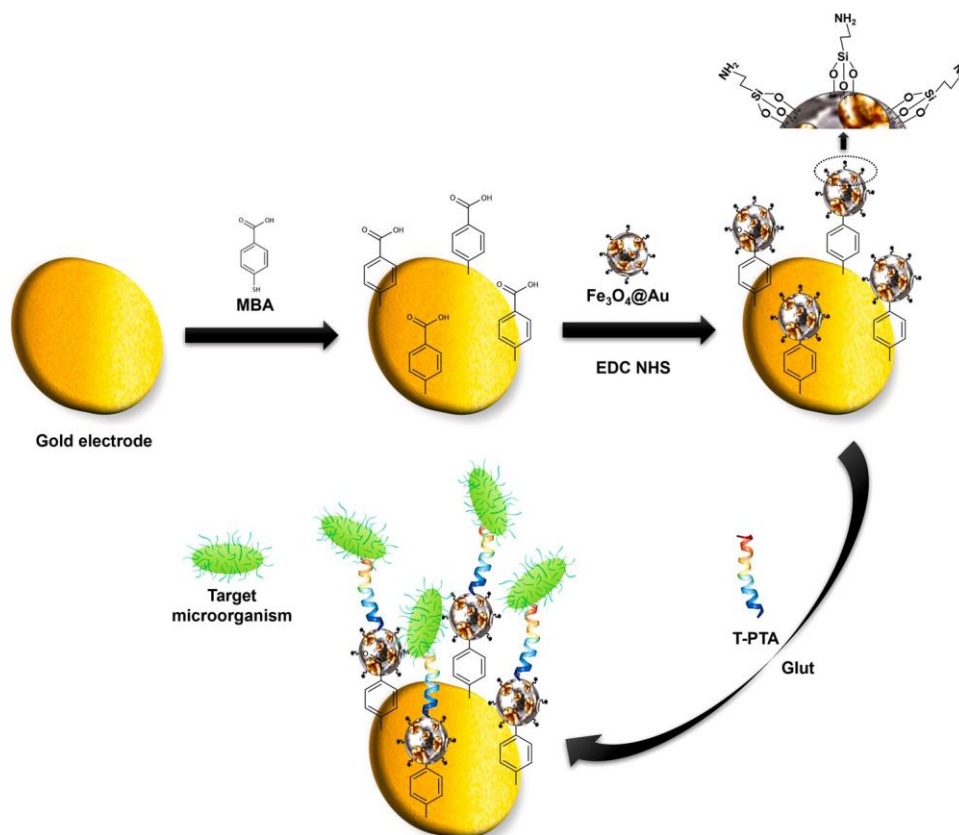


Fig. 1. Schematic illustration of the biosensor stepwise assembly process.

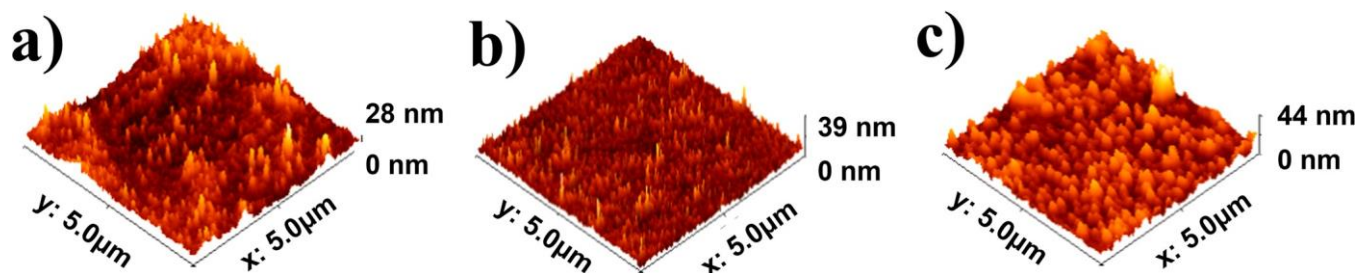


Fig. 2. 3D AFM topography images (5.0 μm $\times$ 5.0 μm) of the biosensor. (a) 4-mercaptobenzoic acid SAM, (b) MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ and (c) MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-T-PTA}$.

suspended in 50 mL of PBS pH 7 with an ultrasonic bath and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ until use.

2.5. Fabrication of the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-T-PTA}$ sensor

The bare gold electrode (BGE) surface was polished using 0.3 μm alumina slurry. To promote the deposition of a self-assembled monolayer (SAM), the BGE was placed in a freshly prepared 50 mM MBA ethanolic solution. Free carboxyl groups from MBA were activated using EDC:NHS coupling chemistry (0.4 M:0.1 M) to promote the covalent bonding with $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-NH}_2$. After 30 min, MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-NH}_2$ modified electrode was immersed for 5 min in glutaraldehyde 10%, and then incubated for 10 min in a 0.67 mM synthetic T-PTA solution to promote its tethering. After each step, the electrode was thoroughly washed with deionized water to remove unbounded molecules. Fig. 1 shows a schematic illustration of the biosensor assembly process.

2.6. Detection of the microbial targets

The MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-T-PTA}$ biosensor system was incubated for

5 min at room temperature in freshly prepared microbial suspensions at different concentrations (10^1 to 10^5 CFU.mL $^{-1}$). Deionized water was used to remove unbound cells, and then the biosensor was subjected to electrochemical analysis. The biosensor was tested against *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, and *C. tropicalis*.

3. Results and discussion

3.1. Topographical characterization

3D AFM images of the modified electrode surface are shown in Fig. 2. The roughness of the sensing platform was assessed through the average roughness (S_a) and root mean square roughness (RMS). The topographic image of the MBA layer is shown in Fig. 2a. The SAM formation revealed a homogeneous surface with a maximum height of 28 nm ($R_a = 4.893$ nm, $RMS = 2.576$ nm). According to the literature, SAMs of thiolated compounds such as MBA reveal similar heights [12]. After the covalent immobilization of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ a fine-grained surface with increased height to 39 nm was observed ($R_a = 2.182$ nm, $RMS = 2.894$ nm), a result supported by a previous study [13]. After

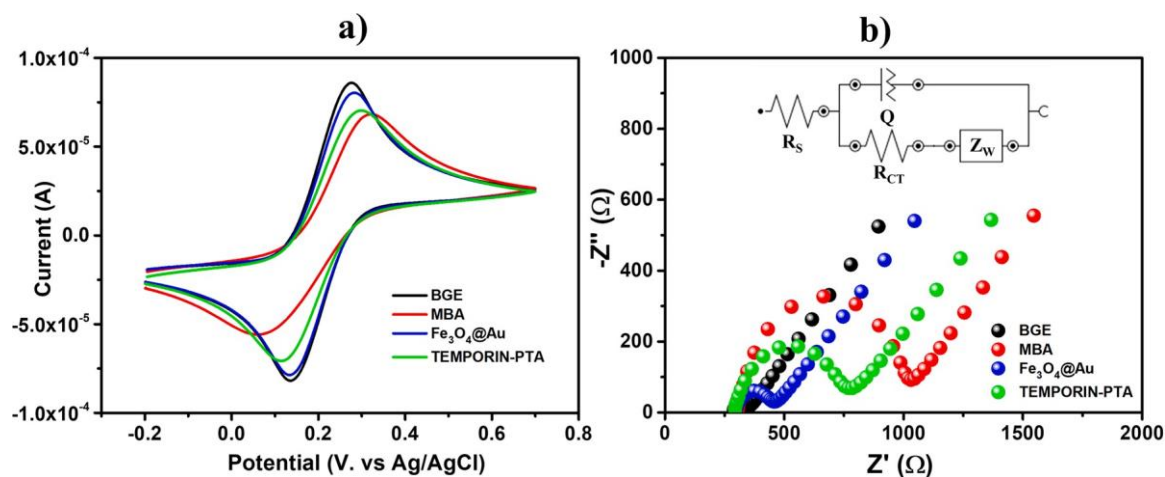


Fig. 3. Cyclic voltammogram (a) and Nyquist plot (b) of the stepwise biosensor modification process. Inset: modified Randles' equivalent circuit used to fit all impedance results.

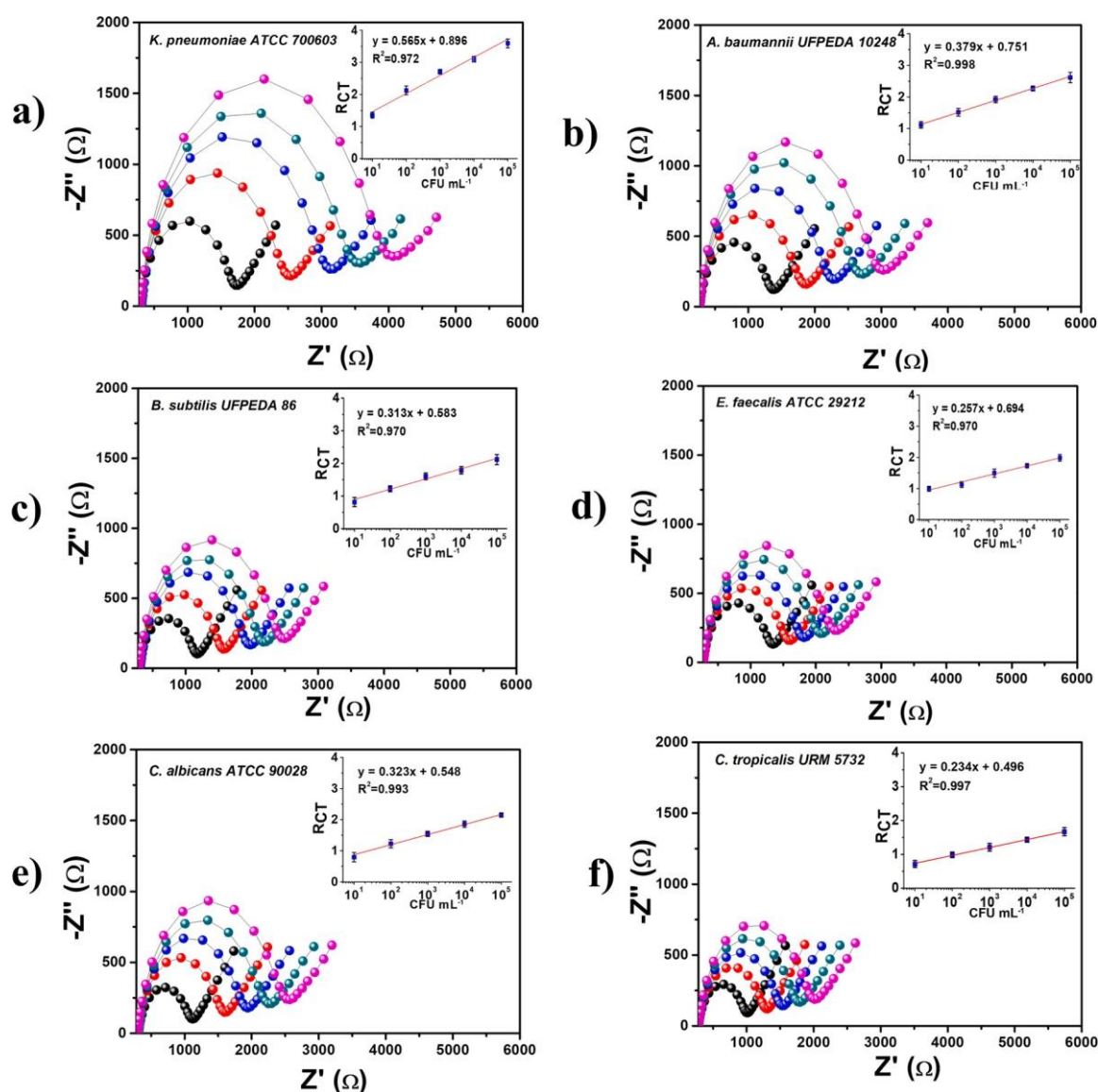


Fig. 4. Nyquist plots of T-PTA biosensor to different concentrations (CFU mL^{-1}) of *K. pneumoniae* (a), *A. baumannii* (b), *B. subtilis* (c), *E. faecalis* (d), *C. albicans* (e) and *C. tropicalis* (f).

T-PTA immobilization, a 5 nm height increase and a noticeable change in the roughness of the topographical profile were observed ($R_a = 3.993$ nm, $RMS = 5.001$ nm). Previous studies have shown similar topographical changes after AMP immobilization [10].

The 3D AFM images after incubation in microorganisms' samples are shown in Fig. S1. The interaction was confirmed in all samples by the changes found in both height and topography, featuring the binding ability of the T-PTA functionalized biosensor. However, microorganisms' membrane debris interactions are expected as well [14].

3.2. Electrochemical characterization of the sensor platform

Voltammetric and impedimetric analyses using $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ as a redox probe are helpful to evaluate the electrochemical reactions occurring in an electrode/electrolyte interface. Cyclic voltammetry characterization showed that the initial BGE anodic and cathodic peaks maxima (iPA 8.6697 A 0.384 A) changed during the T-PTA biosensor assembly process with a reversible response (Fig. 3a). After MBA SAM deposition, current peaks decreased (iPA 6.4642 = ± 0.461 A). This phenomenon shows the blocking of the electron transfer caused by a strong gold-thiol (Au-S) bond [15]. MBA is composed of an aromatic ring that promotes stable tunneling of the electrons from the redox pair, thus improving the biosensor performance. In addition, the carboxylic terminal groups enable the bond to specific biomolecules and functionalized nanoparticles.

After the covalent immobilization of $Fe_3O_4@Au$ redox peak currents increased (iPA 8.0986 A 0.437 A) (Fig. 3a). This behavior is reported in association with the electrical conductivity of the metal nanoparticles favoring the electron transfer [16]. After T-PTA was covalently immobilized on $Fe_3O_4@Au$, a decrease in peak current was observed (iPA 7.0743 A ± 0.299 A), most likely due to its insulant effect hindering the $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ions from reaching the electrode surface.

EIS is adequate to evaluate changes in the electrical double layer and interfacial relationships. Nyquist impedance plots were recorded after impedimetric measurements (Fig. 3b) to inspect the stepwise assembly process of the biosensor. The impedimetric responses were mathematically fitted to a modified Randles' equivalent circuit (inset Fig. 3b) consisting of the electrolyte resistance (R_s) in series with a constant phase element (CPE) in parallel with a charge transfer resistance (R_{CT}) and a Warburg impedance (Z_w). CPE and R_{CT} depend on the dielectric and isolating aspects of the interface of the biosensor with the ionic $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ layer.

R_{CT} values are widely explored in electrochemical biosensors due to their close relationship with the changes in semicircle diameter when physical, chemical, or biological interactions occurring at the electrode surface hinder electronic transfer and/or increase impedance. Of note, the analytical signals and respective R_{CT} values are directly proportional to the concentration of the deposited material. Initial BGE semicircle ($R_{CT} = 0.064$ k $\Omega \pm 0.034$ k Ω) increases after the chemisorption of MBA ($R_{CT} = 0.691$ k $\Omega \pm 0.116$ k Ω), as an indicator of the formation of SAM (Fig. 3b). After the deposition of $Fe_3O_4@Au$ nanoparticles (Fig. 3b) the electron transfer resistance decrease ($R_{CT} = 0.165$ k $\Omega \pm 0.091$ k Ω). The immobilization of T-PTA (Fig. 3b) causes the R_{CT} rebound ($R_{CT} = 0.471$ k $\Omega \pm 0.087$ k Ω), demonstrating the peptide binding on the modified electrode.

3.3. Analytical performance of the biosensor

The performance of the biosensor was evaluated by incubating the biosensor into different microbial suspensions in increasing concentrations ($10^1 - 10^5$ CFU.mL $^{-1}$) with an incubation time of 5 min. The surface charge of the microbial cell is crucial to the interaction with the biosensor; therefore, the experiments were conducted in a controlled PBS medium (10 mM, pH 7) [17].

T-PTA was helpful to detect all six different microbial species,

Table

1
Data of the equivalent circuit elements from fitted impedance results for bacteria and fungi recognition performed by T-PTA.

Modified Electrode	CFU.mL $^{-1}$	R_{CT} (k Ω)	CPE (μF)	R_s	W
T-PTA platform	–	0.47	1.37	0.30	1.54
	10^1	± 0.12	± 0.09	± 0.04	± 0.09
	10^2	± 0.23	± 0.03	± 0.05	± 0.06
	10^3	± 0.14	± 0.03	± 0.05	± 0.04
<i>K. pneumoniae</i>	10^3	2.72	0.96	0.31	1.30
	10^4	± 0.08	± 0.10	± 0.04	± 0.04
	10^5	3.62	0.94	0.29	1.18
	10^1	± 0.20	± 0.07	± 0.02	± 0.04
	10^2	1.07	1.11	0.27	1.45
	10^3	± 0.17	± 0.08	± 0.02	± 0.07
	10^4	1.53	1.03	0.27	1.37
	10^5	± 0.09	± 0.09	± 0.01	± 0.04
<i>A. baumannii</i>	10^3	1.94	0.93	0.27	1.33
	10^4	± 0.12	± 0.06	± 0.01	± 0.06
	10^5	2.34	0.90	0.28	1.28
	10^1	± 0.11	± 0.07	± 0.02	± 0.02
	10^2	2.66	0.88	0.27	1.24
	10^3	± 0.15	± 0.09	± 0.03	± 0.01
	10^4	0.84	1.37	0.30	1.49
	10^5	± 0.09	± 0.11	± 0.01	± 0.05
	10^1	1.23	1.21	0.29	1.48
	10^2	± 0.13	± 0.05	± 0.01	± 0.03
<i>B. subtilis</i>	10^3	1.60	1.16	0.31	1.42
	10^4	± 0.21	± 0.04	± 0.01	± 0.02
	10^5	1.82	1.11	0.30	1.39
	10^1	± 0.14	± 0.06	± 0.02	± 0.03
	10^2	2.11	1.08	0.29	1.36
	10^3	± 0.11	± 0.02	± 0.01	± 0.06
	10^4	1.03	1.80	0.27	1.47
	10^5	± 0.07	± 0.16	± 0.01	± 0.04
	10^1	1.27	1.60	0.28	1.44
	10^2	± 0.09	± 0.13	± 0.01	± 0.02
<i>E. faecalis</i>	10^3	1.49	1.47	0.27	1.42
	10^4	± 0.12	± 0.09	± 0.00	± 0.01
	10^5	1.74	1.40	0.27	1.40
	10^1	± 0.16	± 0.07	± 0.00	± 0.05
	10^2	1.96	1.33	0.28	1.34
	10^3	± 0.08	± 0.12	± 0.01	± 0.09
	10^4	0.77	1.59	0.30	1.43
	10^5	± 0.08	± 0.25	± 0.01	± 0.08
	10^1	1.25	1.36	0.32	1.36
	10^2	± 0.09	± 0.07	± 0.01	± 0.07
<i>C. albicans</i>	10^3	1.57	1.26	0.30	1.35
	10^4	± 0.15	± 0.06	± 0.01	± 0.07
	10^5	1.87	1.22	0.31	1.28
	10^1	± 0.22	± 0.04	± 0.02	± 0.06
	10^2	2.17	1.21	0.29	1.26
	10^3	± 0.13	± 0.04	± 0.02	± 0.02
	10^4	0.69	1.64	0.28	1.51
	10^5	± 0.11	± 0.17	± 0.01	± 0.04
	10^1	0.97	1.45	0.29	1.47
	10^2	± 0.13	± 0.11	± 0.01	± 0.02
<i>C. tropicalis</i>	10^3	1.20	1.37	0.28	1.45
	10^4	± 0.11	± 0.08	± 0.01	± 0.05
	10^5	1.44	1.32	0.29	1.41
	10^1	± 0.12	± 0.06	± 0.02	± 0.06
	10^2	1.67	1.27	0.28	1.36
	10^3	± 0.16	± 0.06	± 0.01	± 0.04

showing the applicability of this innovative biorecognition element when bacteria and yeasts detection is required. Fig. S2 shows the voltammetric responses of the biosensor after the interactions. A proportional to increasing microbial concentrations decrease in both anodic and cathodic peaks was observed after the interactions.

The degree of microbial recognition can be assessed through the percentage of relative deviation of the anodic current variation (ΔI):

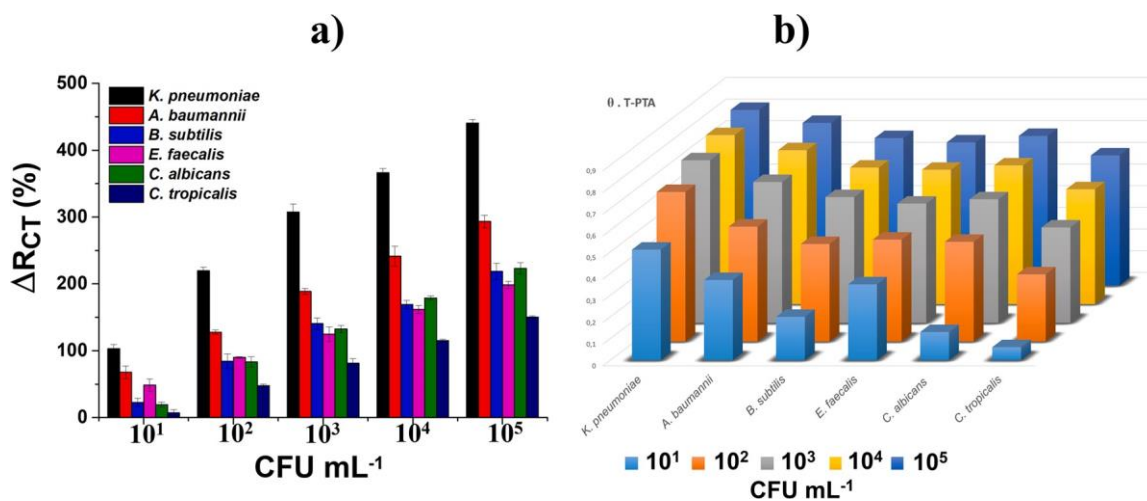


Fig. 5. ΔR_{CT} (a) and surface coverage (b) of the T-PTA biosensor as a function of microorganism concentration (CFU.mL⁻¹).

$$\Delta I \text{ (%) } = \frac{\left[\frac{1}{I_b} - \frac{1}{I_a} \right]}{\frac{1}{I_b}} \times 100$$

Following the parameters obtained in the voltammetric response after the interaction with the microbial species, I_a corresponds to the anodic peak current measured in the biosensor, and I_b is the anodic peak current after microbial interaction (results shown in Table S1). ΔI values are directly related to the bacterial and fungal concentration following the rise of CFU in the test.

Peptide-based sensors can be easily analyzed through impedance spectroscopy [14,18]. In this study, Nyquist plots were employed to evaluate the detection of bacteria and *Candida* species (Fig. 4a-f). Of note, the biosensor showed a significant response for Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae* > *A. baumannii*) and subsequently *C. albicans* > *B. subtilis* > *E. faecalis* > *C. tropicalis*. *In vitro* studies have shown that T-PTA interacts the best with Gram-negative cell membranes. However, we found a broader interaction (although smaller) with Gram-positive bacteria and yeasts in this study. Similar results were observed by other AMP-based biosensor platforms focused on detecting microorganisms of clinical interest [14,19].

When using Randles' equivalent circuit to fit the impedance results, we noticed that most of the expressive differences among all components in the circuit were related to CPE and R_{CT} . CPE reflects the variations in the active surface area of the biosensor concerning the thickness of the electric double layer in the interface. R_{CT} is associated with surface hindering after probe-target interaction, altering the balance of the redox reaction kinetics [20]. From these electrochemical parameters, it was found that the biosensor detected and discriminated among the tested microbial species following the values shown in Table 1. Changes in the semicircle diameter suggest the detection event through the AMP-modified surface. In addition, the difference in variation is proportional to the number of microbial cells present in the dilutions, increasing R_{CT} values. CPE values decrease due to the reduction of free sites in the effective surface area of the electrode [21].

Bacteria recognition results from the attractive forces supported between the positive 3-charge T-PTA and the negative charge of Gram-negative bacterial cells. The initial electrostatic interaction is followed by the insertion and permeabilization of the cell wall [17]. The α -helical amphipathicity for T-PTA structure (FFGSVLKLPKIL-NH₂) improves the electrostatic interaction by stabilizing its helical structure onto the microbial surface [22].

In summary, we obtained a low limit of detection (LOD) within the needs of clinical situations. Bacteremia and bacteriuria have typical concentrations in blood and urine of 15 CFU.mL⁻¹ and 10²-10⁴ CFU.mL⁻¹, respectively [23]. Jiang et al. [24] and Etayash et al. [25]

developed impedimetric sensors for bacterial detection using colicin V and leucocin A (antimicrobial peptides) with a LOD of 10² and 10³ CFU mL⁻¹, respectively. We obtained a LOD of 10¹ CFU mL⁻¹ for all examined microbial species through electrochemical analyses, highlighting the potential of the developed biosensor platforms to detect microbial threats in complex samples. The obtained results disclose the high affinity of T-PTA to bacteria and *Candida* sp. structural components. Therefore, our results corroborate the ability of T-PTA modified electrode to recognize and discriminate among the studied microorganisms according to R_{CT} values. Hence, the developed biosensor was submitted to the evaluation of the relative variation of R_{CT} (ΔR_{CT}):

$$\Delta R_{CT} = \frac{\frac{R_{CT(\text{microorg})} - R_{CT(\text{biosensor})}}{R_{CT(\text{biosensor})}}}{\frac{R_{CT(\text{microorg})} - R_{CT(\text{biosensor})}}{R_{CT(\text{biosensor})}}} \times 100$$

where $R_{CT(\text{microorg})}$ is the value of the R_{CT} after exposure to microbial suspensions and $R_{CT(\text{biosensor})}$ is the R_{CT} value for the T-PTA sensor platform. A summary of these results is shown in Fig. 5a. We observed a direct relationship between ΔR_{CT} values and microbial concentration, suggesting a quantitative response after binding bacteria and yeasts onto the biological recognition layer. As seen in Fig. 4a, we found increasing values as follows: *C. tropicalis* > *E. faecalis* > *B. subtilis* > *C. albicans* > *A. baumannii* > *K. pneumoniae*. Thus, the biosensor platform is helpful in detecting and distinguishing pathogenic microorganisms. The selectivity of the biosensor was performed under the same conditions as described for microorganism detection. The interaction of the biosensor with glucose and glycine at concentration of 100 mM and pure anti-DENV3 antibodies as interfering molecules was evaluated. Typical concentrations of glucose and glycine in human blood are 390 μ M and 3.9 mM L⁻¹, respectively [26,27]. Fig. S3a and b show the impedimetric spectra and ΔR_{CT} of the interfering molecules compared with the lower concentration (10¹ CFU/mL) of three different microbial species. All negative controls revealed an insignificant interfacial resistance due to non-specific adsorption. Moreover, we performed a test in tap water (Fig. S4) where *K. pneumoniae*, *E. faecalis* and *C. tropicalis* were evaluated at a concentration of 10⁶ CFU/mL, presenting R_{CT} values of 4.48 k Ω

± 0.36 k Ω , 2.29 k $\Omega \pm 0.25$ k Ω and 1.95 k $\Omega \pm 0.19$ k Ω , respectively. Compared with the electrochemical response of the sensor in a controlled medium at the same concentration, we observed a slight increase in the impedimetric response that may be related to the water resistivity associated with ions commonly found in tap water, which may interfere with the electrode-redox pair interface [28]. Through the degree of surface coating (θ), we obtain complementary information about the filling of free sensor binding sites after microbial adherence, as follow:

Table 2

Analytical performance of AMP-based biosensors for microbial detection compared to T-PTA biosensor.

Recognition element	Sensor Platform	Transducer	Limit of detection (CFU.mL ⁻¹)	Microbial target	Reference
AMP (Clavanin A)	AuNPs	CV and EIS	10 ¹ CFU.mL ⁻¹	<i>S. typhimurium</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	[14]
AMP (Warnericin RK)	GaAs/AlGaAs DIP biosensor	Fluorescence Microscopy	10 ³ CFU.mL ⁻¹	<i>L. pneumophila</i>	[34]
AMP (Leucocin A)	Gold interdigitated array with cysteamine	EIS	10 ³ CFU.mL ⁻¹	<i>L. monocytogenes</i>	[25]
AMP (C16G2cys and G10KHc)	Gold microfluidic chip	EIS	10 ⁵ CFU.mL ⁻¹	<i>S. mutans</i> <i>P. aeruginosa</i>	[32]
AMP (synthetic AMP – sAMP)	Gold-disk electrode	CV and EIS	10 ² CFU.mL ⁻¹	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidemidis</i>	[35]
AMP (Clavanin A)	MWCNTs	EIS	10 ² CFU.mL ⁻¹	<i>K. pneumoniae</i> <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. faecalis</i>	[19]
AMP (Temporin-PTA)	Fe ₃ O ₄ @Au on Gold surface-MBA	CV and EIS	10 ¹ CFU.mL ⁻¹	<i>K. pneumoniae</i> <i>A. baumannii</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. faecalis</i> <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	This work.

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT} (recog)}{R_{CT} (target)}$$

where $R_{CT} (recog)$ is the electron transfer resistance of the biorecognition sensing layer MBA-Fe₃O₄@Au-T-PTA and $R_{CT} (target)$ is the R_{CT} values after exposure to microbial species. As observed in Fig. 5b, θ values increase proportionally to the microbial concentration defined in CFU mL⁻¹. At 10² CFU mL⁻¹, θ is ~0,69 (69%) and ~0,53 (53%) for *K. pneumoniae* and *A. baumannii*, respectively. Of note, lower θ values were observed for Gram-positive and *Candida* species. The results given by ΔR_{CT} and θ proved the filling of the biorecognition layer by microbial samples with specific electrochemical responses based on structural features in the cell wall of pathogenic bacteria and yeasts.

3.4. Properties of T-PTA for microbial recognition

Among multiple sensing elements for detecting microorganisms, numerous studies in electrochemical sensors highlight the use of antibodies, specific sequences of nucleic acid, and aptamers. Farka et al. [29] developed an impedimetric immunosensor (LOD = 10³ CFU mL⁻¹) to detect *Salmonella typhimurium* using a cysteamine monolayer. Roushani et al. [30] detected *Pseudomonas aeruginosa* using a glassy carbon electrode aptasensor (LOD = 33 CFU.mL⁻¹). Although these biosensors have the advantage of specific detection associated with the robustness of aptamers their backbone is seemingly irregular and unstable folding to the target resulting in weak sensitivity and selectivity [31].

On the other hand, the use of proteins and peptides as recognition elements has increased due to their robust sensing features based on specific structural components of various biomolecules and cells. In addition, continuous development is expected since AMPs have gained attention in the pharmaceutical industry and biomedical diagnostic due to their advantages in treating drug-resistant infections. Lillehoj et al. [32] developed a microfluidic chip functionalized with AMPs (C16G2cys and G10KHc) for *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* detection (LOD = 10⁵ CFU mL⁻¹). Andrade et al. [19] demonstrated an impedimetric biosensor based on Clavanin A assembled on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). Clavanin A effectively detects Gram-negative species (*K. pneumoniae* and *E. coli*). Nonetheless, the LOD obtained with our T-PTA-functionalized biosensor (10¹ CFU mL⁻¹, with a linear range of 10¹-10⁵ CFU mL⁻¹) is lower than most peptide-based sensor platforms, as summarized in Table 2.

The AMP-microorganism interaction occurs mainly due to electrostatic attraction and the amphipathic profile of their α -helical conformation. When this mechanism activates, the loss in transmembrane potential and consecutive insertion into the inner microbial membrane [22] is directed by the AMP charge. Bacterial cells are mainly composed of phosphatidylglycerol and cardiolipin's anionic phospholipids. Gram-positive bacteria have a superficial anionic nature due to lipoteichoic acid (LTA) linked to the peptidoglycan layer (a carboxyl and

phosphate-rich structure). On the other hand, fungal membranes are composed of a zwitterionic phospholipid layer associated with ergosterol, resulting in a relatively neutral surface [32]. The proposed mechanism of action of T-PTA with microorganisms is not fully elucidated. However, the mechanism of action of antimicrobial peptides generally comprises some well-established models such as the toroidal, barrel stave, and carpet model. After the initial interaction with the microorganism, the orientation of peptides predicts that AMP adopts a position parallel to the lipid bilayer folding into an amphipathic conformation. After increasing the peptide-lipid ratio, AMP is allocated perpendicularly to the membrane, initiating the insertion process [33]. Thus, T-PTA was adequate to detect and discriminate between Gram-positive/negative bacteria and yeasts cells.

4. Conclusions

We developed a nanostructured biosensor modified with the T-PTA antimicrobial peptide to detect bacterial and fungal cells with a high point in the discrimination of negative bacteria. The topographical analysis demonstrated an effective immobilization of the T-PTA peptide to the nanoparticles. Impedimetric and voltammetric results indicate that T-PTA peptide detects microbial species based on the R_{CT} variation. The biosensor revealed expressive electrochemical responses to Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae* and *A. baumannii*). The sensor platform showed a low LOD within a linear range (10¹ to 10⁵ CFU.mL⁻¹). This promising biosensor is expected to expand the handling of AMPs as biological probes in the alternative diagnostic of microbial infections.

CRedit authorship contribution statement

Alberto G. da Silva Junior: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Isaac A. M. Frias:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Reginaldo G. Lima-Neto:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Ludovico Migliolo:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Patrícia S. e Silva:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing – original draft. **Maria D.L. Oliveira:** Methodology, Investigation, Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition. **César A.S. Andrade:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 314894/2018-7, 314756/2018-3, and 435059/2018-1), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Science and Technology Support Foundation of Pernambuco State/FACEPE (BCT-0056-2.09/18 and APQ-0384-2.01/19). Isaac A. M. Frías would like to thank CAPES and FACEPE for the post-doctoral fellowship (APQ-0437-4.03/17). Alberto G. Silva Júnior would like to thank CAPES for the Ph.D. scholarship. We acknowledge Dr. Sandra R. Sá for her helpful assistance with the bacteria samples.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.jpba.2022.114788](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114788).

References

- [1] Y.X. Ma, C.Y. Wang, Y.Y. Li, J. Li, Q.Q. Wan, J.H. Chen, F.R. Tay, L.N. Niu, Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections, *Adv. Sci.* 7 (2020), <https://doi.org/10.1002/adv.201901872>.
- [2] F. Lamothe, S.R. Lockhart, E.L. Berkow, T. Calandra, Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis, *J. Antimicrob. Chemother.* 73 (2018) i4–i13, <https://doi.org/10.1093/jac/dkx444>.
- [3] M. Safavi, C. Coarsey, N. Esiobu, A. Memic, J.M. Vyas, H. Shafiee, W. Asghar, Advances in Candida detection platforms for clinical and point-of-care applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 37 (2017) 441–458, <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1167667>.
- [4] J. Rychert, Benefits and limitations of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of microorganisms, *J. Infect.* 2 (2019) 1–5, <https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>.
- [5] T. Islam, M.M. Hasan, A. Awal, M. Nurunnabi, A.J.S. Ahammad, Metal nanoparticles for electrochemical sensing: progress and challenges in the clinical transition of point-of-care testing, *Molecules* (2020) 8–13.
- [6] V. Nares, N. Lee, A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors, *Sens. (Switz.)* 21 (2021) 1–35, <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- [7] M. Hoyos-Nogués, F.J. Gil, C. Mas-Moruno, Antimicrobial peptides: Powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies, *Molecules* 23 (2018) 1–24, <https://doi.org/10.3390/molecules23071683>.
- [8] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn, Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6 (2016) 1–12, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
- [9] Y. Hu, H. Li, R. Qu, T. He, X. Tang, W. Chen, L. Li, H. Bai, C. Li, W. Wang, G. Fu, G. Luo, X. Xia, J. Zhang, Lysine Stapling Screening Provides Stable and Low Toxic Cationic Antimicrobial Peptides Combating Multidrug-Resistant Bacteria in Vitro and in Vivo, *J. Med. Chem.* 65 (2022) 579–591, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01754>.
- [10] K.L. Ribeiro, I.A.M. Frías, A.G. Silva, R.G. Lima-Neto, S.R. Sá, O.L. Franco, M.D. L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Impedimetric clavm peptide-based sensor differentiates ploidy of Candida species, *Biochem. Eng. J.* 167 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107918>.
- [11] F. Malvano, R. Pilloton, D. Albanese, A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide nisin for the detection of Salmonella spp, *Food Chem.* 325 (2020), 126868, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126868>.
- [12] J.C.S. da Costa, M.C. Pagotto, C.N.P.R. Casas, M.A. Vargas, J.C. Barros, J. Antonio, J.A.Z. Bermudez, Avaliação do setor produtivo farmoquímico no Brasil: capacitação tecnológica e produtiva, *Rev. Eletrônica Comun. Inf. Inov. Em Saúde* 8 (2014) 443–460, <https://doi.org/10.3395/reciis.v8i4.853.pt>.
- [13] J. Liu, X. Wang, W. Zhang, Atomic force microscopy imaging study of aligning DNA by dumbbell-like Au-Fe 3 O 4 magnetic nanoparticles, *Langmuir* 34 (2018) 14875–14881, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01784>.
- [14] A.G. Silva Junior, M.D.L. Oliveira, I.S. Oliveira, R.G. Lima-Neto, S.R. Sá, O. L. Franco, C.A.S. Andrade, A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin A peptide for bacterial detection, *Sens. Actuators, B Chem.* 255 (2018) 3267–3274, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.153>.
- [15] Y. Xue, X. Li, H. Li, W. Zhang, Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–9, <https://doi.org/10.1038/ncomms5348>.
- [16] E. Katz, Synthesis, properties and applications of magnetic nanoparticles and nanowires—A brief introduction, *Magnetochemistry* 5 (2019) 61, <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5040061>.
- [17] Y. Ram, T. Yoezt-Kopelman, Y. Dror, A. Freeman, Y. Shacham-Diamand, Impact of molecular surface charge on biosensing by electrochemical impedance spectroscopy, *Electrochim. Acta* 200 (2016) 161–167, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.162>.
- [18] J.L. de Miranda, M.D.L. Oliveira, I.S. Oliveira, I.A.M. Frías, O.L. Franco, C.A. S. Andrade, A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection, *Biochem. Eng. J.* 124 (2017) 108–114, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.013>.
- [19] 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 Surf. B Biointerfaces* 135 (2015) 833–839, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.037>.
- [20] P. Córdoba-Torres, T.J. Mesquita, R.P. Nogueira, Relationship between the origin of constant-phase element behavior in electrochemical impedance spectroscopy and electrode surface structure, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 4136–4147, <https://doi.org/10.1021/jp512063f>.
- [21] R. Saxena, S. Srivastava, An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit, *Sens. Actuators, B Chem.* 297 (2019), 126780, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126780>.
- [22] T.-H. Lee, K.N. Hall, M.-I. Aguilar, Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: A focus on the role of membrane structure, *Curr. Top. Med. Chem.* 16 (2015) 25–39, <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121700>.
- [23] K. Tullus, Defining urinary tract infection by bacterial colony counts: A case for 100,000 colonies/mL as the best threshold, *Pediatr. Nephrol.* 34 (2019) 1651–1653, <https://doi.org/10.1007/s00467-019-04283-x>.
- [24] 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, <https://doi.org/10.1039/C5AY01917F>.
- [25] 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, <https://doi.org/10.1021/ac4034938>.
- [26] J.A. Schmidt, S. Rinaldi, A. Scalbert, P. Ferrari, D. Achaintre, M.J. Gunter, P. N. Appleby, T.J. Key, R.C. Travis, Plasma concentrations and intakes of amino acids in male meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans: A cross-sectional analysis in the EPIC-Oxford cohort, *Eur. J. Clin. Nutr.* 70 (2016) 306–312, <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.144>.
- [27] H.W. Liao, J. Saver, H.C. Yeh, C.H.S. Chen, Y.L. Wu, M. Lee, B. Ovbiagele, Low fasting glucose and future risks of major adverse outcomes in people without baseline diabetes or cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis, *BMJ Open* 9 (2019), <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026010>.
- [28] W.C. Lin, Z. Li, M.A. Burns, A drinking water sensor for lead and other heavy metals, *Anal. Chem.* 89 (2017) 8748–8756, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00843>.
- [29] Z. Farka, T. Juřík, M. Pastucha, D. Kovář, K. Lacina, P. Skládal, Rapid immunosensing of salmonella typhimurium using electrochemical impedance spectroscopy: the effect of sample treatment, *Electroanalysis* 28 (2016) 1803–1809, <https://doi.org/10.1002/elan.201600093>.
- [30] M. Roushani, M. Sarabaegi, F. Pourahmad, Impedimetric aptasensor for Pseudomonas aeruginosa by using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles, *Microchim. Acta* 186 (2019), <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3858-y>.
- [31] L. Zhao, X. Qi, X. Yan, Y. Huang, X. Liang, L. Zhang, S. Wang, W. Tan, Engineering aptamer with enhanced affinity by triple helix-based terminal fixation, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 17493–17497, <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09292>.
- [32] 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 (2014) 42–49, <https://doi.org/10.1177/2211068213495207>.
- [33] Z. Qiao, Y. Fu, C. Lei, Y. Li, Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review, *Food Control* 112 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107116>.
- [34] M.A. Islam, W.M. Hassen, A.F. Tayabali, J.J. Dubowski, Antimicrobial warnericin RK peptide functionalized GaAs/AlGaAs biosensor for highly sensitive and selective detection of Legionella pneumophila, *Biochem. Eng. J.* 154 (2020), 107435, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107435>.
- [35] X. Liu, M. Marrakchi, D. Xu, H. Dong, S. Andreescu, Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria, *Biosens. Bioelectron.* 80 (2016) 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.041>.