



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102017027390-3 A2



(22) Data do Depósito: 18/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 12/04/2022

(54) Título: BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA SP

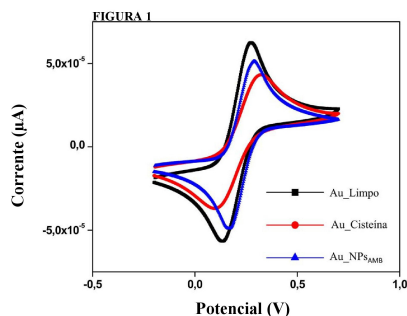
(51) Int. Cl.: G01N 33/569; C12Q 1/04.

(52) CPC: G01N 33/569; C12Q 1/04.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): SANDRA REGINA DE SÁ; CÉSAR AUGUSTO DE SOUZA ANDRADE; REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO; MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA.

(57) Resumo: BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp. A presente invenção é resultado de uma metodologia simples para a obtenção de nanopartículas de ouro com modificação através do ácido mercaptobenzóico (AMB) através da adição direta do AMB as nanopartículas de ouro com posterior deposição na superfície do eletrodo, sendo essa interação permitida pela cisteína favorecendo a sua aplicação na elaboração de um dispositivo de diagnóstico focado em metodologias inovadoras em saúde com alta sensibilidade e especificidade para a detecção de espécies de Candida. Assim, alcançamos uma técnica de preparação por meio de automontagem através da eletrodeposição de nanopartículas de ouro modificadas com AMB (NpsAuAMB) sobre a superfície do eletrodo de ouro modificado com cisteína. As NpsAuAMB são usadas para imobilizar biomoléculas (as lectinas) utilizada em nosso trabalho a WGA, devido às suas propriedades, tais como reconhecimento específico a carboidratos presente na superfície da parede celular dos microrganismos, condução eficiente do sinal eletroquímico entre transdutor e interface o que permite amplificar a resposta elétrica e assim essas substâncias usadas no desenvolvimento do biosensor oferece uma camada auto-montada de forma comprovadamente eficiente. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram úteis para o acompanhamento das etapas (...).



BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO *CANDIDA* sp

Campo da Invenção

1. A presente invenção é aplicável à área do diagnóstico através do uso de biossensores eletroquímicos nanoestruturados, e refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos. A invenção baseia-se no uso de lectinas devido à capacidade das mesmas para o reconhecimento de carboidratos presentes na superfície da parede celular de microrganismos. Para o desenvolvimento da camada sensora, as lectinas (tipo específico de proteína) são quimicamente ligadas a superfície de nanopartículas de ouro modificadas com ácido mercaptobenzóico (NpsAu-AMB). Ademais, o biossensor desenvolvido é efetivo para a identificação de *Candida* spp., causadora de candidemia, e detecção em amostras com baixas concentrações do patógeno. A candidemia acomete pacientes hospitalizados, principalmente os internados em Unidades de Terapia Intensiva, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em hospitais. A identificação do microrganismo é demorada, levando no mínimo 3 dias para o diagnóstico, além de necessitar de mão de obra especializada. Essas técnicas se baseiam principalmente em provas bioquímicas como assimilação e fermentação de carboidratos, formação de tubos germinativos a 37°C dentre outras, como alteração de cor da colônia através de indicadores de pH.

2. A candidemia é uma infecção grave que acomete a corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*. A *Candida albicans* é o patógeno mais comumente isolado, porém espécies de *Candida* não-*albicans* estão em emergência nos últimos anos. Essa a incidência de episódios de candidemia vem aumentando no decorrer dos anos, devido ao grande número de pacientes imunocomprometidos reconhecidos como de risco para essas infecções, como neutropênicos, transplantados, diabéticos, entre outros. Esse processo implica com o aumento do tempo de internação

hospitalar, com aumento dos custos e a uma taxa de mortalidade, que pode variar de 25-75%. Pelo menos dezessete espécies de *Candida* são relacionada a candidemia e vários fatores podem influenciar diante de qual espécie estará causando a infecção. Por exemplo, o uso de fluconazol, a capacidade em formar biofilme, o uso de cateteres venoso central, sonda vesical de demora e ventilação mecânica pelos pacientes. A *C. tropicalis*, por exemplo, é um potencial agente oportunista quando o paciente apresenta neutropenia e quando há alteração da microbiota bacteriana. A *C. krusei* é outro importante patógeno entre os pacientes com doenças hematológicas malignas e entre receptores de transplantes de medula óssea, e é caracterizada por resistência intrínseca ao fluconazol. Dessa maneira, observamos a necessidade de identificar o patógeno por sua espécie.

3. As nanopartículas apresentam diversas aplicações como carreadores para entrega controlada de fármacos, separação de proteínas e de células, detecção de patógenos e desenvolvimento de sensores eletroquímicos para o diagnóstico de diversas patologias. Outra aplicação para as partículas metálicas é o seu uso para a marcação de moléculas biológicas, como por exemplo, anticorpos, DNA e lectinas proporcionando também aplicações nas áreas médicas e veterinárias e no diagnóstico de doenças causadas por diferentes patógenos. As nanopartículas de ouro também têm demonstrado vasto potencial em diferentes aplicações biológicas, incluindo a sua utilização no desenvolvimento de métodos diagnósticos altamente sensíveis. As NPsAu apresentam a vantagem de apresentarem reduzido tamanho, com elevada razão área/volume, alta homogeneidade, fácil preparação e superfície química reativa a qual permite a ligação de moléculas orgânicas. A associação de NpsAu com lectinas representa uma importante estratégia para viabilizar a aplicação biotecnológica das lectinas em processos de biodetecção. A aglutinina de germe de trigo (WGA) foi caracterizada em 1974, por Nagata e Burger, como uma molécula de massa molecular igual a 17 kDa e coeficiente de sedimentação 2,1 S, em solução ácida, porém como um dímero de 35 kDa, em pH neutro. WGA possui afinidade a N-acetil-glucosamina, existindo dois sítios de ligação por molécula, mas também possui alta afinidade a di e trisacarídeos β -1,4 ligados. Além destes, possui afinidade aos resíduos de ácido siálico.

Sumário

4. O invento aqui descrito é oriundo da aplicação de uma técnica simples para a obtenção de nanopartículas de ouro (NpsAu) decoradas com ácido mercaptobenzóico (AMB) e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores com elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de candidemias. Desta forma, descrevemos um método de preparação por meio da técnica de automontagem através da associação de NpsAu, AMB e lectina. As nanopartículas da presente invenção proporcionam diversas vantagens, dentre as quais podemos citar o incremento das propriedades elétricas e área de superfície. Destacamos ainda que a síntese de NpsAu em escala nanométrica leva a uma elevação em sua reatividade, bem como a sua rápida degradação. A fim de melhorar a sua biocompatibilidade e estabilidade há a possibilidade de conjugação com outros materiais como, por exemplo, o AMB. O ouro associado ao AMB proporciona estabilidade química adequada *para a funcionalização com oligonucleotídeos, proteínas, biomoléculas, dentre outros*, além de possuir alta condutibilidade térmica, baixa resistividade elétrica e baixa interação com o oxigênio para formação de óxidos.

Anterioridades: Estado da Técnica

5. A candidemia é uma infecção generalizada caracterizada pela presença de microrganismos do gênero *Candida* na corrente sanguínea. Cerca de 80% dos pacientes que adquirem a candidemia vão a óbito. A confirmação do diagnóstico da candidemia é demorado e dependendo da técnica empregada custosa e necessitando de mão de obra especializada. Dentre essas técnicas podemos citar taxonomia clássica, reação em cadeia da polimerase (PCR), identificação pelo CHROMagar *Candida* e o automático, sendo comumente usado para diagnosticar a candidemia. No entanto, estes métodos são geralmente complicados e demorados. Por isso o desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e seletivos para a detecção de espécies de *Candida* é importante. Recentemente, o uso de eletrodos nanoestruturados na área da química analítica vem se tornando uma tendência, a fim de melhorar a sensibilidade, seletividade e rendimento de

sensores analíticos eletroquímicos e biossensores. Atribui-se o aumento do desempenho eletroanalítico de eletrodos nanoestruturados a sua alta condutividade, a grande área de superfície, a estabilidade e biocompatibilidade. Diferentes métodos de modificação de eletrodo são utilizados para aumentar a sua sensibilidade e especificidade atenuando assim os inconvenientes inerentes na detecção do analito.

6. O uso de eletrodos nanoestruturados nas ciências biomédicas vem se tornando uma tendência, a fim de diminuir o tempo de diagnóstico, além da sensibilidade, seletividade e especificidade. Atribui-se o aumento do desempenho eletroanalítico de eletrodos nanoestruturados a sua alta condutividade, a grande área de superfície, a estabilidade e biocompatibilidade. Diferentes métodos de modificação de eletrodo são utilizados para aumentar a sua sensibilidade e especificidade atenuando assim os inconvenientes inerentes na detecção do analito.

7. Várias são as aplicações das nanopartículas (NPs) quando se apresentam em escalas nanométrica. Uma das características observadas por essas NPs é a aplicabilidade funcionando como transdutores, transporte de massa, presença de densidade de carga na superfície podendo ocorrer uma oscilação dos elétrons, fenômeno esse conhecido de ressonância de plasmons. Em relação aos biossensores, podemos observar um aumento de área onde é possível recobri-la com vários tipos de ligantes específicos.

8. Novas técnicas de diagnóstico vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de elaborar metodologias eficientes no diagnóstico rápido e preciso desta doença. Podemos citar a patente WO 2014160844 A2, que se refere ao processo modificação de nanopartículas magnéticas resultando em nanopartículas muito sensíveis que podem ser usadas em uma variedade de métodos de diagnóstico e analíticos, especialmente em biossensores.

9. A patente US20080193965 A1 apresenta a construção de um biossensor piezoelétrico para a detecção de microrganismos através do reconhecimento de carboidratos de superfície utilizando a lectina Concanavalina A. A presente invenção difere das demais supracitadas devido ao desenvolvimento de dispositivos nanoestruturados baseados em NpsAu modificadas com ácido mercaptobenzóico.

10. A presente invenção demonstra um processo de síntese de NpsAu modificadas com ácido mercaptobenzóico e sua utilização na montagem de um biossensor eletroquímico visando sua utilização principalmente, mas não restrita, na área biomédica para a detecção de candidemia.

11. A presente invenção mostra um processo de desenvolvimento de uma camada sensora baseada em cisteína, NPsAu-AMB e WGA e sua aplicação no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos visando sua utilização principalmente, mas não restrita, na área biomédica para reconhecimento de carboidratos de superfície presentes em microrganismos.

12. As diferenças existentes entre as patentes descritas podem ser visualizadas através da comparação na Tabela I.

Tabela I. Comparação entre os componentes característicos de cada invento.

	Invento apresentado	WO 2014160844 A2	US 20030129618 A1	US 20080193965 A1	US 20120214172 A1
NPsAu modificada com AMB	Sim	Não	Não	Não	Não
Cisteína	Sim	Não	Não	Não	Não
Con A	Sim	Não	Sim	Sim	Não

Problemas e Limitações do Estado da Técnica

13. O principal problema encontrado no estado presente da técnica é a limitação da quantidade de lectina imobilizada no biossensor. Afim de reverter esta situação e aumentar a quantidade de lectina imobilizada na superfície do eletrodo usamos os

nanomateriais, nanopartículas de ouro modificadas com ácido mercaptobenzóico (AMB). As mesmas indicadas por poder apresentar elevada área superficial e excelentes propriedades eletroquímicas.

Objetivos da Invenção

14. O objetivo da presente invenção é apresentar um biossensor impedimétrico nanoestruturado baseado em nanopartículas de ouro modificadas com o ácido mercaptobenzóico. A presente invenção permite análises em menor tempo e dispensa mão de obra especializada e melhorando a acurácia, uma vez que esta técnica revelou especificidade no bioreconhecimento ao diagnóstico de candidemia.

Solução

15. A presente invenção é a obtenção de um biossensor impedimétrico nanoestruturado com maior eficiência para imobilização de moléculas e com capacidade para o reconhecimento específico do microrganismo proporcionando um diagnóstico rápido e preciso. Isso faz com que este dispositivo forneça a vantagem em comparação aos métodos atuais de diagnóstico da candidemia além de apresentar-se como uma técnica com eficiência de tempo e custo.

Vantagens

16. O dispositivo produzido é capaz de detectar eletroquimicamente carboidratos na superfície da parede da candida, apresentando-se como uma promissora ferramenta para aplicação na área biomédica. Uma das vantagens é a conjugação das propriedades elétricas, proporcionando o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos mais eficientes, pois as combinações de distintas propriedades possibilitam potenciais aplicações.

17. O biodispositivo da invenção apresenta respostas satisfatórias frente a diferentes concentrações da *Candida sp* (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6) em amostras analisadas. Ademais, destaca-se o fácil manuseio, sendo uma extrema vantagem pois permite sua aplicação em laboratórios de análises clínicas, além de laboratórios de ensino e pesquisa.

A novidade e o efeito técnico alcançado

18. A novidade da presente invenção é a metodologia diagnóstica utilizando biossensores nanoestruturados a base de nanopartículas de ouro e ácido mercaptobenzóico. Trata-se de uma plataforma inédita para o diagnóstico de candidemias. Ao melhor do nosso conhecimento, até o presente momento, não foi identificada nenhum dispositivo similar disponível na literatura ou no mercado.

Descrição Detalhada

19. Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção.

20. Resumidamente, para montagem do nanocompósito foi utilizado uma solução aquosa de nanopartículas de ouro sintetizadas através da diluição de 1 mL de ácido tetracloroaurico (HAuCl_4) em 99 mL de água. Em seguida foi adicionado 4 mL de citrato de sódio, o qual atuou como estabilizante a uma temperatura de 60 °C por 35 minutos. Posteriormente, as nanopartículas de ouro foram diluídas em água na proporção de 1:4 (v/v) e quimicamente modificadas pela adição de 0,2 mL de ácido mercaptobenzóico (10^{-3} M) sob agitação magnética a temperatura ambiente por um período de 2 horas.

21. Após preparação do nanocompósito, a camada sensora começou a ser desenvolvida. O eletrodo de ouro foi polido com uma lixa com água deionizada, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio durante aproximadamente 5 minutos com posterior lavagem. Em seguida, 2 μL de cisteína foi adicionado a

superfície do eletrodo por 15 minutos, seguida de lavagem e adição de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e N-Hidroxisuccinimida (EDC-NHS) realizando a homogenização dos dois na proporção de 1:1 e em seguida 2 µL foram retirados e adicionado a superfície do eletrodo para ativar os grupos funcionais da camada estruturada de cisteína e permitir a ligação das nanopartículas de ouro modificadas. Em sequência, foi adicionado 2 µL das NPsAu+AMB sobre o eletrodo por um período de 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com água deionizada o eletrodo foi novamente modificado com adição de 2 µL de EDC-NHS para permitir a ligação entre as nanopartículas de ouro modificadas (NPsAu+AMB) e a WGA, permanecendo em repouso por 30 minutos. Finalmente, a amostra de Candida em várias diluições foi exposta ao sistema sensor.

Síntese e caracterização das nanopartículas

Preparação de Nanopartículas

22. As nanopartículas de ouro foram obtidas pelo aquecimento de 0,01% do ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) a 80°C sob agitação vigorosa. Em seguida, acrescentou-se uma solução de citrato tri-sódico (1%, p/v) à solução em ebulição, resultando numa mudança de cor de amarelo pálido para vermelho escuro indicando a formação de nanopartículas de ouro.

Caracterização de Nanopartículas

23. As análises impedimétricas e amperométricas foram realizadas com potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Holanda), em uma célula eletroquímica de três elétrodos, imersos numa solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ na proporção (1:1), utilizada como sonda redox. A superfície do eletrodo de trabalho foi de ouro. Eletrodos de fio de platina e Ag/AgCl (solução saturada de KCl) foram usados como eletrodo auxiliar e de

referência, respectivamente. Os experimentos impedimétricos foram realizados a uma faixa de frequência entre 100 mHz e 100 kHz, com um potencial aplicado de 10 mV. Análise de amperométricas foram realizadas em um intervalo de potenciais entre 0,7 V e -0.2V a uma taxa de varredura de 50 mV.s⁻¹.

Características das nanopartículas

24. O princípio básico utilizado no desenvolvimento do biodispositivo foi a capacidade de reconhecimento da lectina WGA, denominada de camada sensora, que vai se ligar a carboidratos na superfície da parede celular de *Candida* sp. Diferentes concentrações de *Candida* sp foram imobilizados para testar a sensibilidade do dispositivo aqui descrito.

25. A Fig. 1 mostra os voltamogramas cíclicos do processo de montagem do biossensor, onde podemos observar no gráfico de voltamograma a cor em preto com picos anódicos e catódicos bem definidos, característicos de um processo limitado por difusão. Com a adição da cisteína vemos a diminuição acentuada destes picos (cor em vermelho no gráfico), caracterizando assim a ligação efetiva à superfície do eletrodo. Após a adição das nanopartículas de ouro modificadas observa-se um aumento das I_{pa} e I_{pc} (cor em verde no gráfico), onde este aumento demonstra a condutividade da plataforma sensora. Após adição das NPs vemos um aumento acentuado destes picos, caracterizando assim a aderência destas a superfície do biossensor a cisteína (voltamograma em azul). A figura 2 apresenta os Diagramas de Nyquist onde observamos o eletrodo sem modificações (cor em preto) apresenta um comportamento quase linear devido o processo ser limitado por difusão. Com a adição da cisteína (cor em vermelho), o comportamento muda e observa-se um aumento do semi-círculo, característico do aumento da resistência proporcionado pela adição da cisteína. No gráfico a cor em azul é apresentado o resultado da ligação das NPs à superfície do biossensor. É possível notar nítida diminuição do diâmetro do semicírculo quando comparado com o eletrodo após adição da cisteína, pós ser uma camada mais condutora.

26. A Fig. 3 e 4 demonstra o resultado do processo de montagem do biossensor, onde podemos observar no voltamograma em preto as correntes de picos anódicos (Ipa) e catódicos (Ipc) bem definidos do eletrodo limpo. Com a adição da cisteína vemos a diminuição acentuada destes picos (cor em vermelho no gráfico), e aumento do semi-círculo no gráfico de Nyquist caracterizando assim a ligação efetiva à superfície do eletrodo. Após a adição das nanopartículas de ouro modificadas observa-se um aumento das Ipa e Ipc (cor em azul no gráfico), onde este aumento demonstra a condutividade da plataforma sensora e com diminuição do semi-círculo. Posteriormente, a adsorção da lectina resulta em redução das Ipa e Ipc comprovando assim a ligação e formação da camada sensora formada pela cisteína, nanopartículas de ouro modificadas com ácido mercaptobenzóico e a presença da lectina (cor representada em verde no gráfico). No gráfico de Nyquist, as mesmas são comprovadas através do aumento do diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist proporcional a resistência à transferência de carga.

27. As Figuras 5 e 6 apresentam o gráfico de voltametria e impedância onde o eletrodo sem modificações (preto) em sua superfície apresenta gráfico com um comportamento quase linear devido o processo ser limitado por difusão, no gráfico em vermelho observa-se a ligação da cisteína a superfície do biossensor. É possível notar nítido aumento do diâmetro do semicírculo quando comparado com o eletrodo sem modificação, seguida por um decréscimo deste diâmetro quanto a eletrodeposição da nanopartículas devido às suas características condutoras. O semicírculo volta a aumentar e esta característica se mantém à medida que as camadas vão sendo acrescidas ao dispositivo, refletido pelo aumento gradual de sua resistência para o sistema cisteína-nanopartículas-lectina como para o sistema após bioreconhecimento em adição da *Candida* sp. o que corrobora com as análises de voltametria cíclico. Sendo assim, no voltamograma cíclico é possível observar que após cada etapa de modificação do eletrodo de ouro, há uma redução da resposta amperométrica do sistema. Em adição, se observa comportamento oposto em relação a análise impedimétrica onde o semi-círculo de Nyquist é proporcional a concentração da amostra.

28. A Fig. 7 demonstra uma representação esquemática do processo de desenvolvimento do biossensor eletroquímico para candidemia.

REIVINDICAÇÕES

01. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp é um biossensor caracterizado por ser formado pelos componentes a seguir: a) uma molécula de reconhecimento (Lectina WGA) uma aglutina do germe de trigo b) um suporte onde em sua superfície será feita a imobilização das moléculas, c) uma fonte de corrente elétrica, d) Nanopartículas de ouro (NpsAu) modificadas com ácido mercaptobenzóico e) Cisteína, promovendo a interação entre as NPsAu_{AMB} com a superfície de ouro, sendo a detecção do analito realizada através da análise das interações interfaciais do eletrodo.

02. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp conforme reivindicação 1 caracterizado pela presença de nanopartículas de ouro que são obtidas a partir de um processo de modificação de superfície com ácido mercaptobenzóico sobre a superfície do eletrodo de ouro modificada com cisteína.

03. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp, conforme reivindicação 1 e 2 é caracterizado pela deposição das Nanopartículas de ouro modificadas com ácido mercaptobenzóico (NPsAu_{AMB}) a superfície do eletrodo favorecido pela cisteína através dos grupos amino-carboxilo pela ativação do EDC-NHS.

04. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp, refere-se a métodos e composições para identificação de patógenos, caracterizado por

basear-se no biorreconhecimento da lectina WGA a carboidratos presentes na superfície da parede celular dos microrganismos.

05. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp é obtido pela mobilização das moléculas, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo fato da referida superfície ser de ouro, o que proporciona uma maior condutibilidade elétrica e biocompatibilidade ao dispositivo facilitando assim a interações moleculares.

06. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp caracterizado pela obtenção de NPsAu_{AMB}, onde foram diretamente depositadas sobre o eletrodo de trabalho previamente modificado com o cisteína, para a análise eletroquímica foi utilizada uma faixa de potencial de -0,2 a 1,3 V vs Ag / AgCl ciclado 30 vezes a uma velocidade de varredura de 50 mV/s⁻¹, numa solução a 1mM de H₂AuCl₄ contendo 0,5M de H₂SO₄.

07. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp, caracterizado pela modificação camada a camada da superfície do biodispositivo seguida da análise impedimétrica e voltamétrica, ao término de cada período de incubação da etapa de modificação a lavagem foi executada com água deionizada.

08. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp de acordo com a reivindicação 6, caracterizada por utilizar os métodos de detecção

espectroscópica por meio de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Voltametria Cíclica.

09. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando NPsAu_{AMB}, conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o grupamento amina expostos pelo cisteína é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas de ouro via eletrodeposição.

10. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que as referidas nanopartículas acumulam as propriedades magnéticas e elétricas do ouro, sendo portanto importantes ferramentas na construção de biossensores.

11. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro conforme reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a lectina na superfície da nanopartícula proporciona um biorreconhecimento a carboidratos na superfície do microrganismos, proporcionando ao referido biossensor uma alta especificidade da resposta.

12. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro, conforme reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida análise é feita em uma faixa de frequência de 100 MHz e 100 kHz e numa faixa de potencial de -0,2V e 0,7 V, respectivamente.

13. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da NPsAu_{AMB} em biossensores abrangendo ao menos um agente imobilizador e no mínimo um agente ativador das ligações moleculares, para a elaboração de ferramentas para uso diagnóstico.

14. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula de ouro em biossensores, abrangendo ao menos um agente imobilizador e no mínimo um agente ativador das ligações para o desenvolvimento de biodispositivos eletroquímicos.

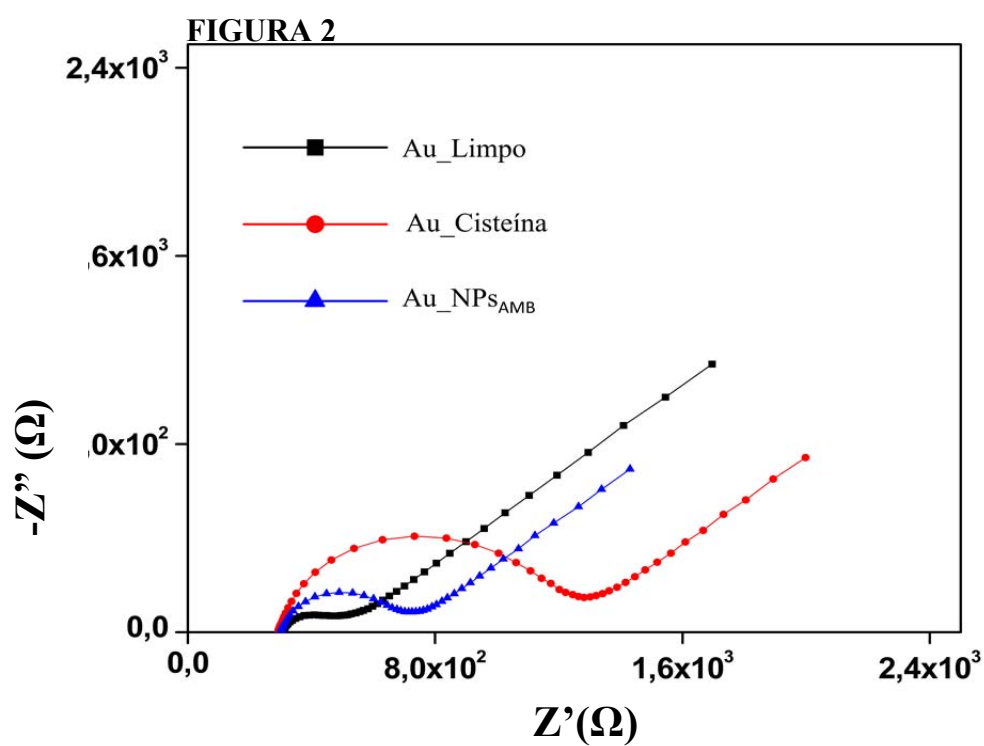
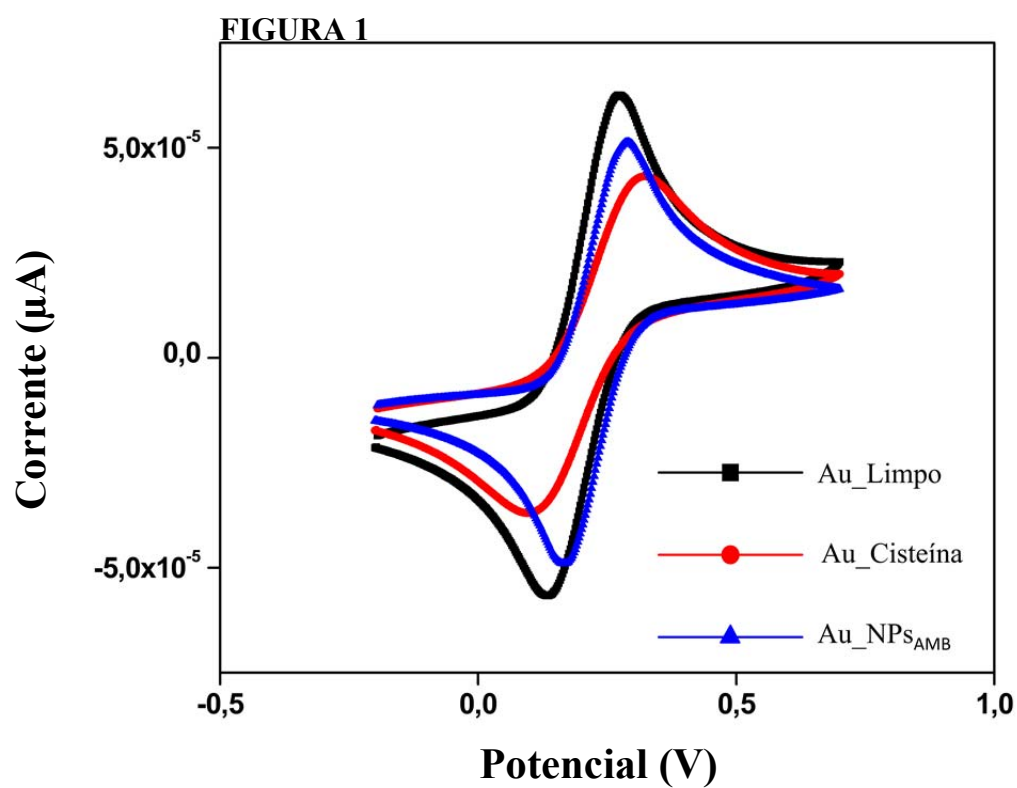
15. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro modificadas com AMB, caracterizado pelo uso da referida nanopartícula em biossensores, conforme reivindicação 12, em que o referido dispositivo é um biossensor eletroquímico.

16. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula de ouro em biossensores na área médica, biológica e farmacológica.

17. O BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO CANDIDA sp utilizando nanopartículas de ouro caracterizado pelo uso da nanopartícula de ouro em

biossensores e no uma molécula de biorreconhecimento do microrganismo para elaboração de biossensores e biodispositivos.

FIGURAS



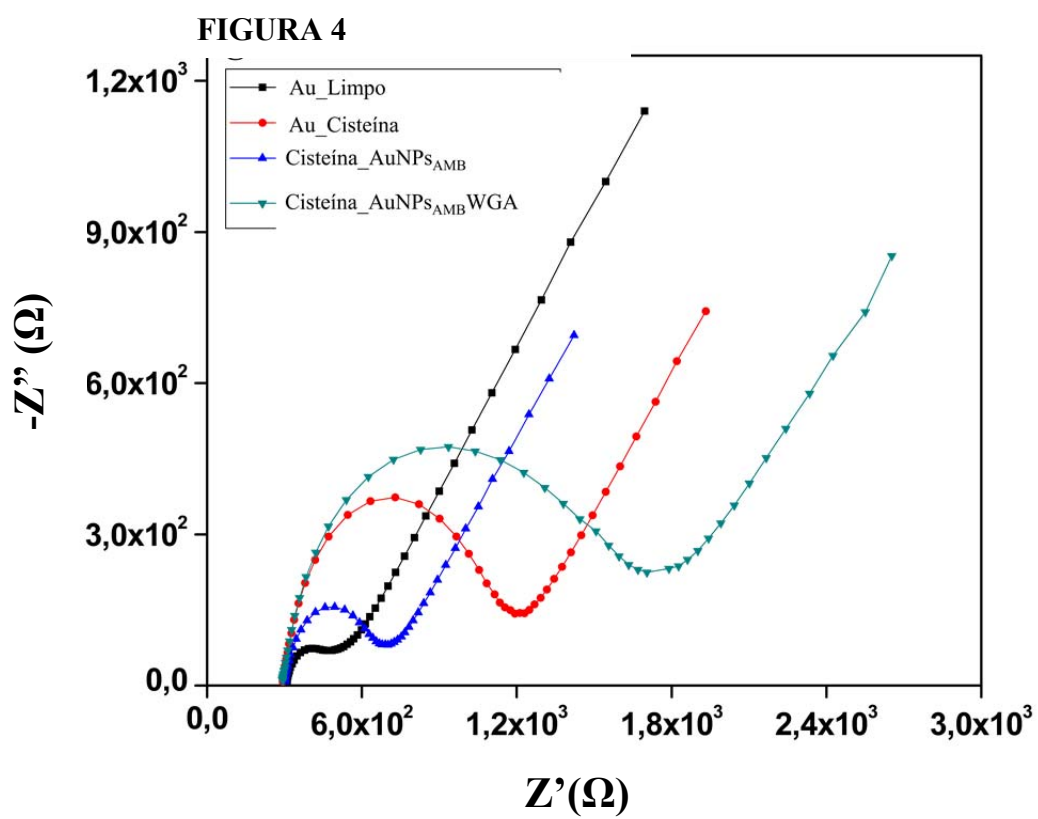
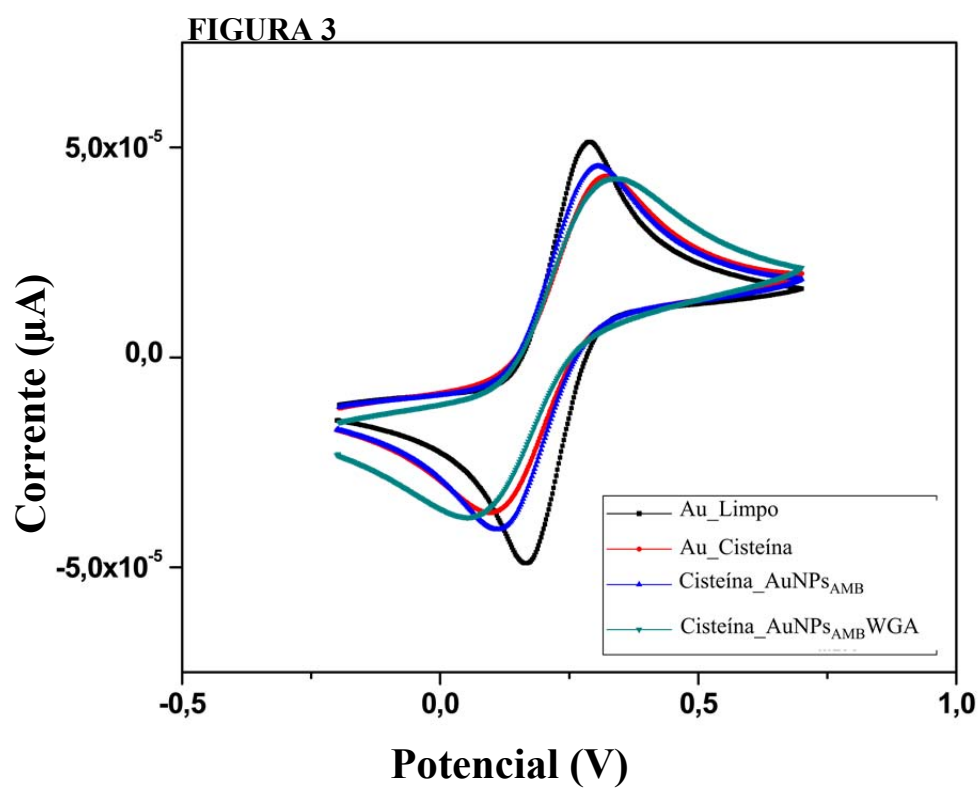


Figura 5

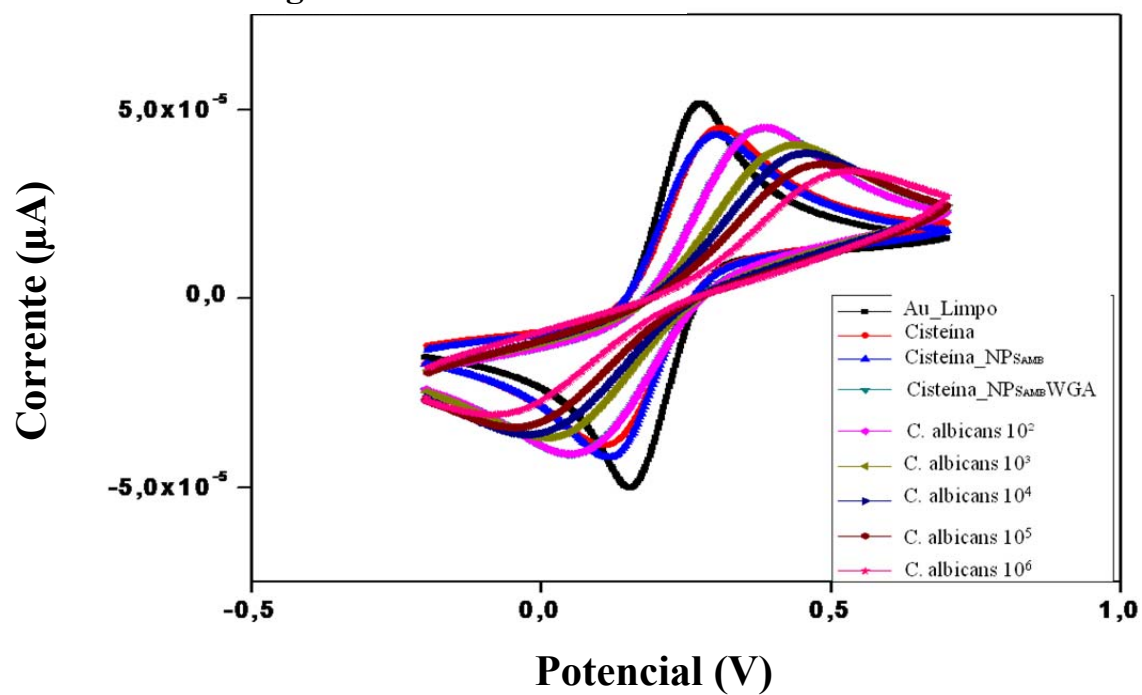


Figura 6

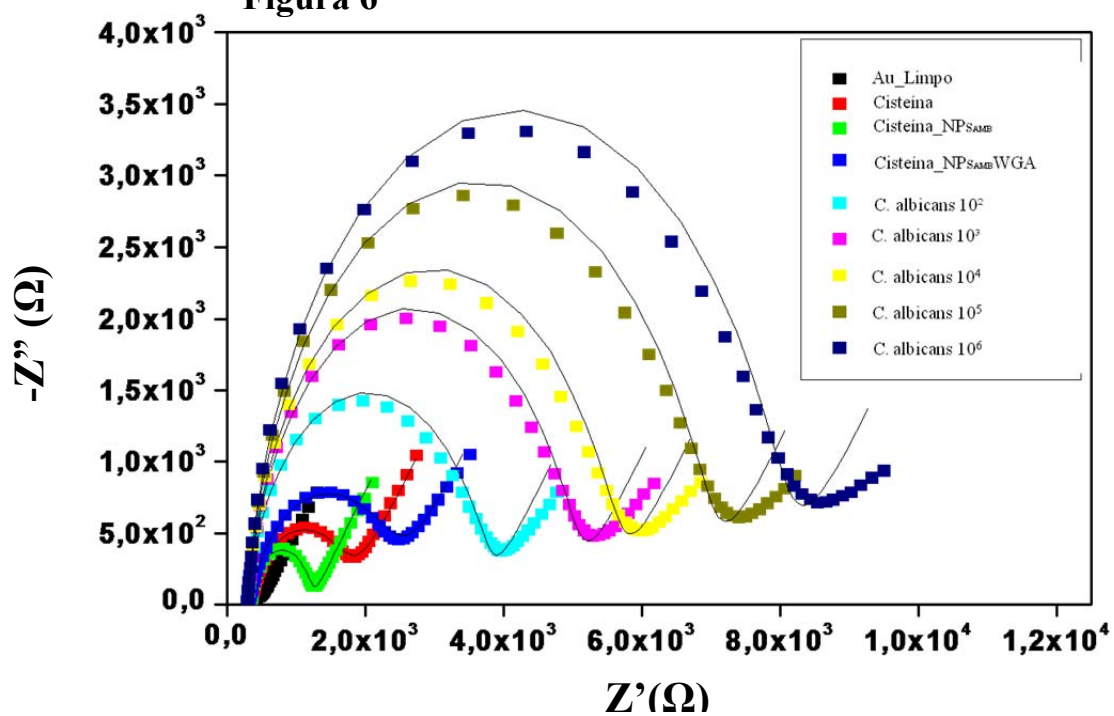
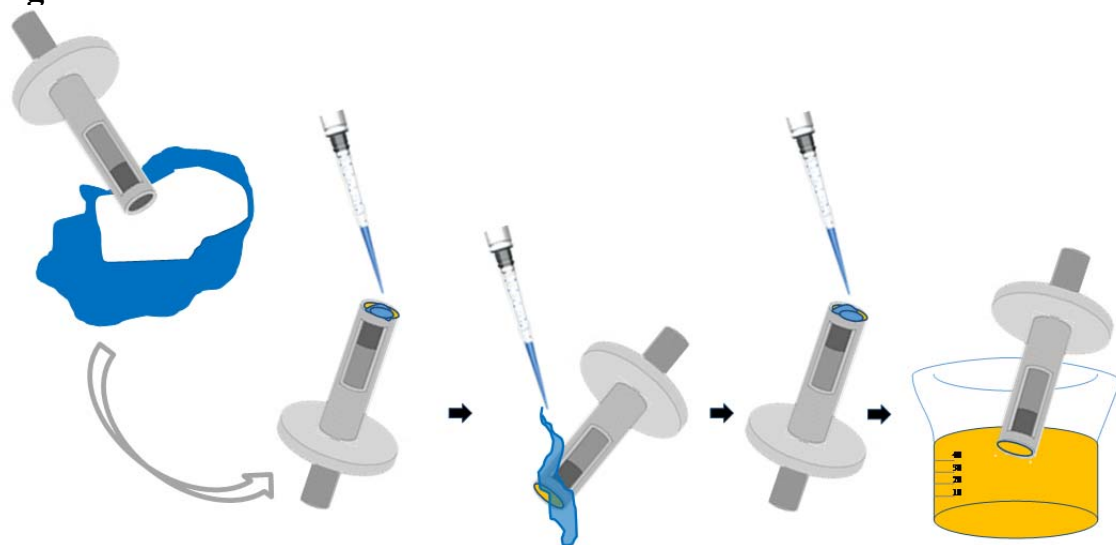


Figura 7

RESUMO**BIODISPOSITIVO SENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO *CANDIDA* sp**

A presente invenção é resultado de uma metodologia simples para a obtenção de nanopartículas de ouro com modificação através do ácido mercaptobenzóico (AMB) através da adição direta do AMB as nanopartículas de ouro com posterior deposição na superfície do eletrodo, sendo essa interação permitida pela cisteína favorecendo a sua aplicação na elaboração de um dispositivo de diagnóstico focado em metodologias inovadoras em saúde com alta sensibilidade e especificidade para a detecção de espécies de *Candida*. Assim, alcançamos uma técnica de preparação por meio de automontagem através da eletrodeposição de nanopartículas de ouro modificadas com AMB ($\text{NpsAu}_{\text{AMB}}$) sobre a superfície do eletrodo de ouro modificado com cisteína. As $\text{NpsAu}_{\text{AMB}}$ são usadas para imobilizar biomoléculas (as lectinas) utilizada em nosso trabalho a WGA, devido às suas propriedades, tais como reconhecimento específico a carboidratos presente na superfície da parede celular dos microrganismos, condução eficiente do sinal eletroquímico entre transdutor e interface o que permite amplificar a resposta elétrica e assim essas substâncias usadas no desenvolvimento do biosensor oferece uma camada auto-montada de forma comprovadamente eficiente. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram úteis para o acompanhamento das etapas de modificação do eletrodo e observação do biorreconhecimento entre a lectina e o microrganismo por meio do indicador redox ferro-ferricianeto de potássio. O sistema biossensível desenvolvido apresenta a capacidade de detecção de espécies de *Candida* em baixas concentrações sendo eficiente na identificação de espécies de *Candida* causadoras de candidemia, uma grave infecção da corrente sanguínea.