



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

(21) BR 102019012453-9 A2



(22) Data do Depósito: 17/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 29/12/2020

(54) **Título:** DISPOSITIVO NANOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO ATRAVÉS DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO

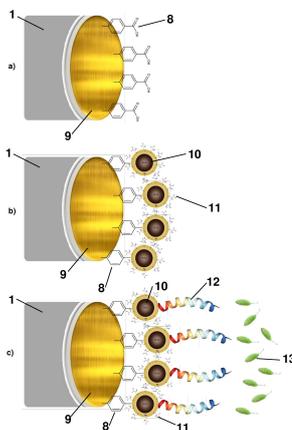
(51) **Int. Cl.:** A61K 35/76; C12M 1/34.

(52) **CPC:** A61K 35/76; C12M 1/34.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO CATÓLICA; UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO.

(72) **Inventor(es):** ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR; ISAAC AARÓN MORALES FRIAS; MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA; REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO; SANDRA REGINA DE SÁ; OCTÁVIO LUIZ FRANCO; OSMAR NASCIMENTO SILVA; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE.

(57) **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-mercaptopenzóico (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.



**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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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>
<i>Invenção Proposta</i>	Sim	Sim (Fe ₃ O ₄ @Au)	Sim (Clavanina A)	Não
<i>WO2018102350</i>	Não	Sim (Fe ₂ O ₃)	Não	Não
<i>US20120156688A1</i>	Não	Não	Sim (Magainina 1)	Não
<i>US20050059105A1</i>	Não	Não	Não	Sim
<i>CN204203160U</i>	Não	Sim (AuNPs)	Não	Sim
<i>WO2014159904A1</i>	Não	Não	Sim (Indolicidina, Cecropina- Melitina, Bactenecina, Polimixina E)	Não
<i>US20070231833A1</i>	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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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 (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV-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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{-Cys}$) a ser utilizada na plataforma biossensora nanoestruturada da presente invenção é obtida por: $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{-Cys}$ 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 ressuspendidas em água ultrapura e estocada a $5\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$.

32. O peptídeo antimicrobiano ClavA ($\text{VFQFLGKIIHHVGNFVHGFHVHVF-NH}_2$) 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 ($\phi = 2\text{ mm}$) 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 Fe₃O₄@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 Fe₃O₄@Au. Finalmente, entre 50-150µM do peptídeo antimicrobiano ClavA foi adsorvido no eletrodo de ouro modificado, resultando na obtenção do sistema biossensor MBA_Fe₃O₄@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 10¹ a 10⁶ UFC.mL⁻¹. Tal processo foi realizado através da espectroscopia UV-Vis com densidade óptica em 60nm e ajustado para 0.50. 4µL da suspensão bacteriana em determinada concentração (10¹ a 10⁶ 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{-Cys}$ (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) 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 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 interspécies. 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 (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-

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 clavamin 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ do tipo *core-shell* com a superfície modificada pela L-cisteína;
 - e) peptídeo antimicrobiano Clavanina A.
- 2) Dispositivo nanossensor, conforme Reivindicação 1, **caracterizado por** ter eletrodos conectados a um potenciostato e circuito para medida da impedância.
- 3) Dispositivo nanossensor, conforme Reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ter 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 1-15mM) preparado em etanol absoluto, com posterior lavagem com água deionizada ultrapura para remoção de moléculas não ligadas;
 - b) funcionalização de nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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 10mM 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 0,7V) e espectroscopia de impedância eletroquímica nas frequências de 100mHz a 100kHz com amplitude e onda senoidal variando entre 1-15mV.

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 100mHz a 100kHz com amplitude e onda senoidal variando entre 5-15mV;

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, caracterizado pelos analitos-alvo serem microrganismos, compreendendo bactérias, fungos, vírus, protozoários e helmintos.

10) Uso do dispositivo nanossensor da Reivindicação 1, caracterizado por ocorrer 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.

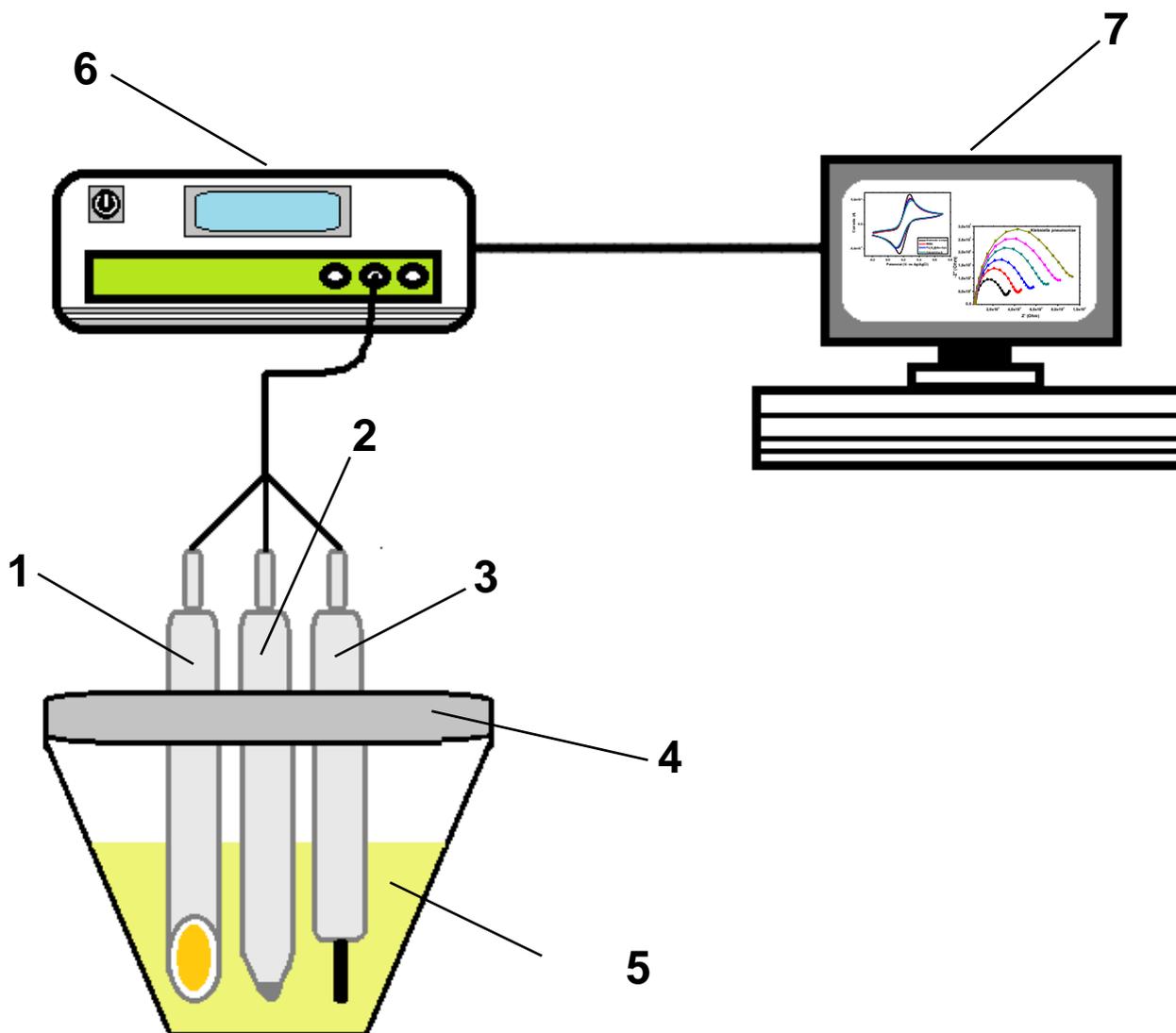


Figura 1

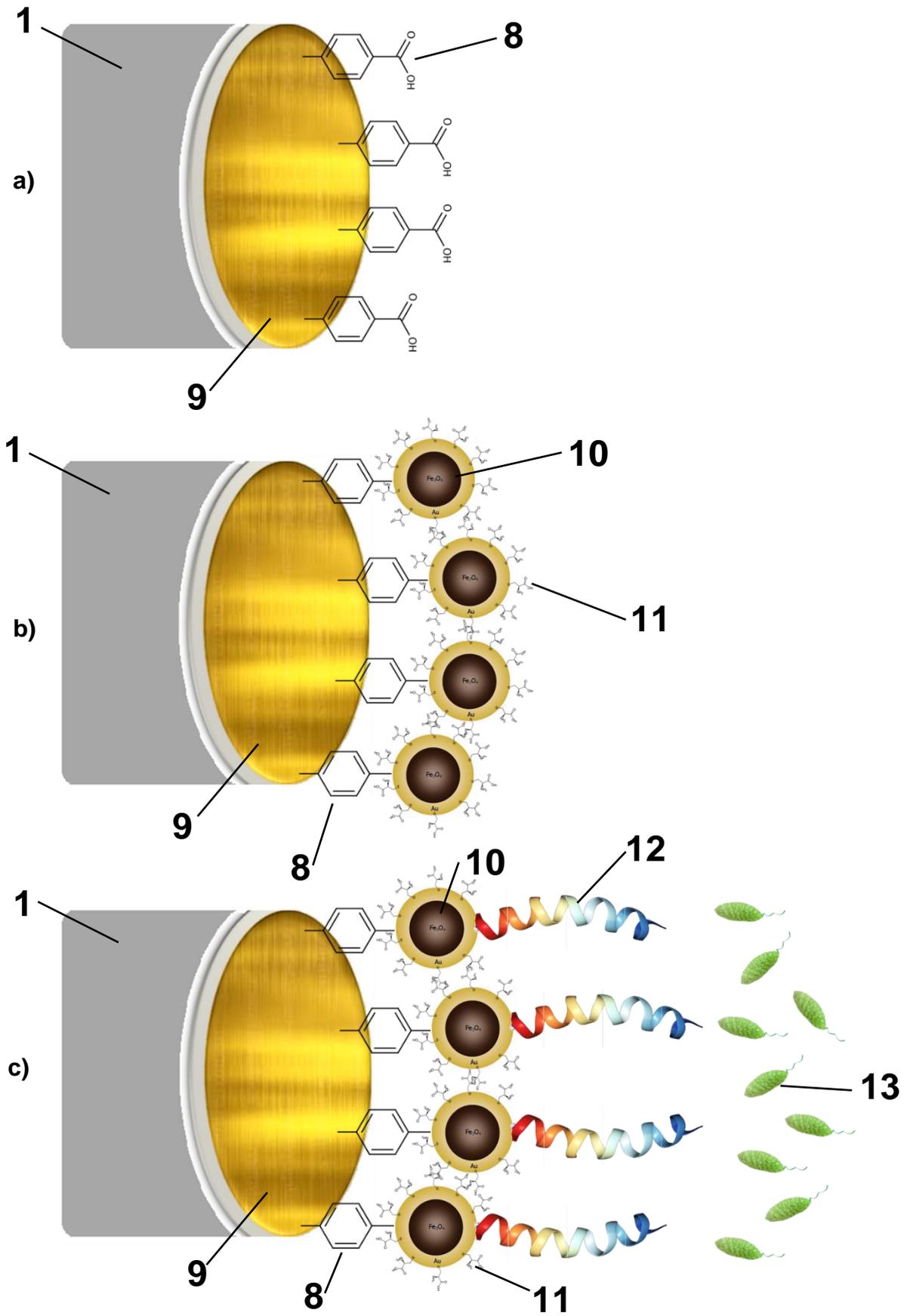


Figura 2

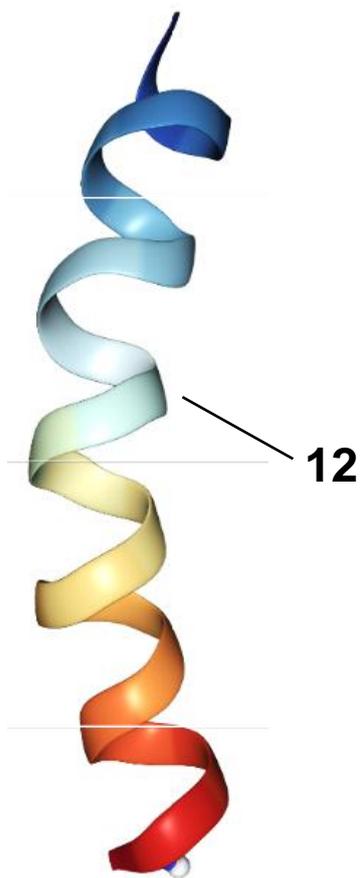


Figura 3

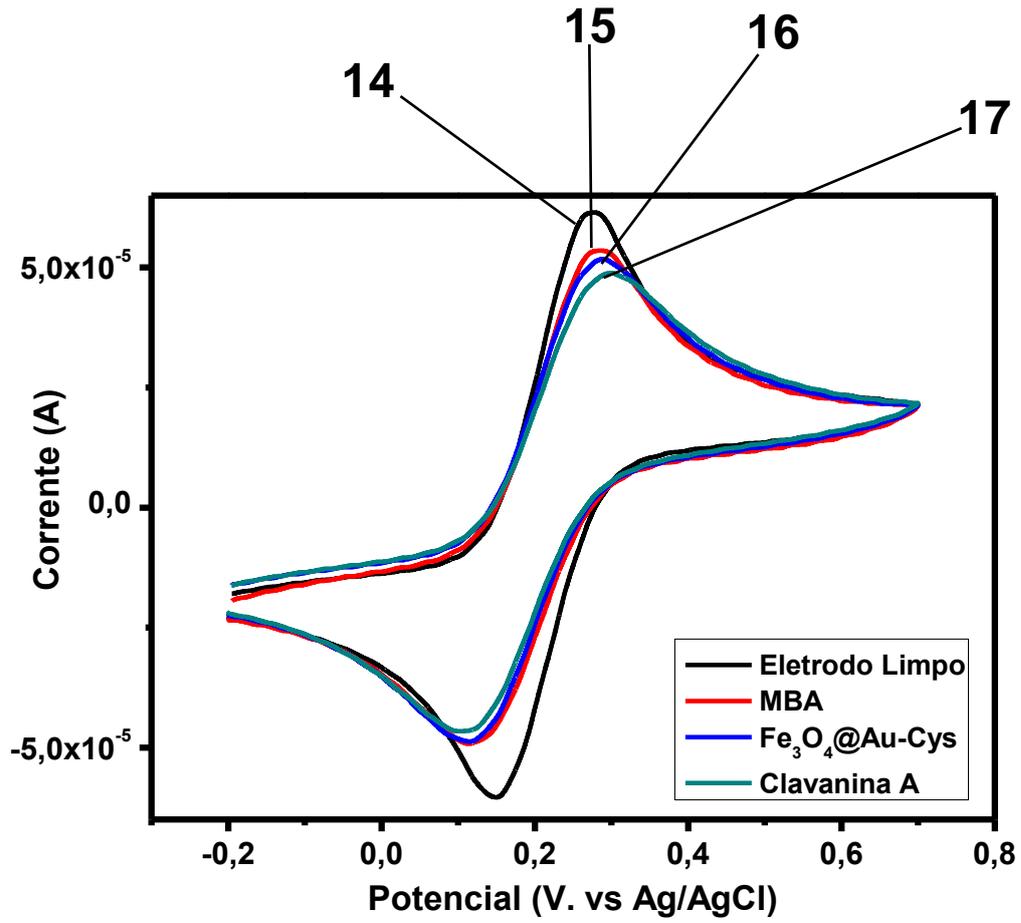


Figura 4

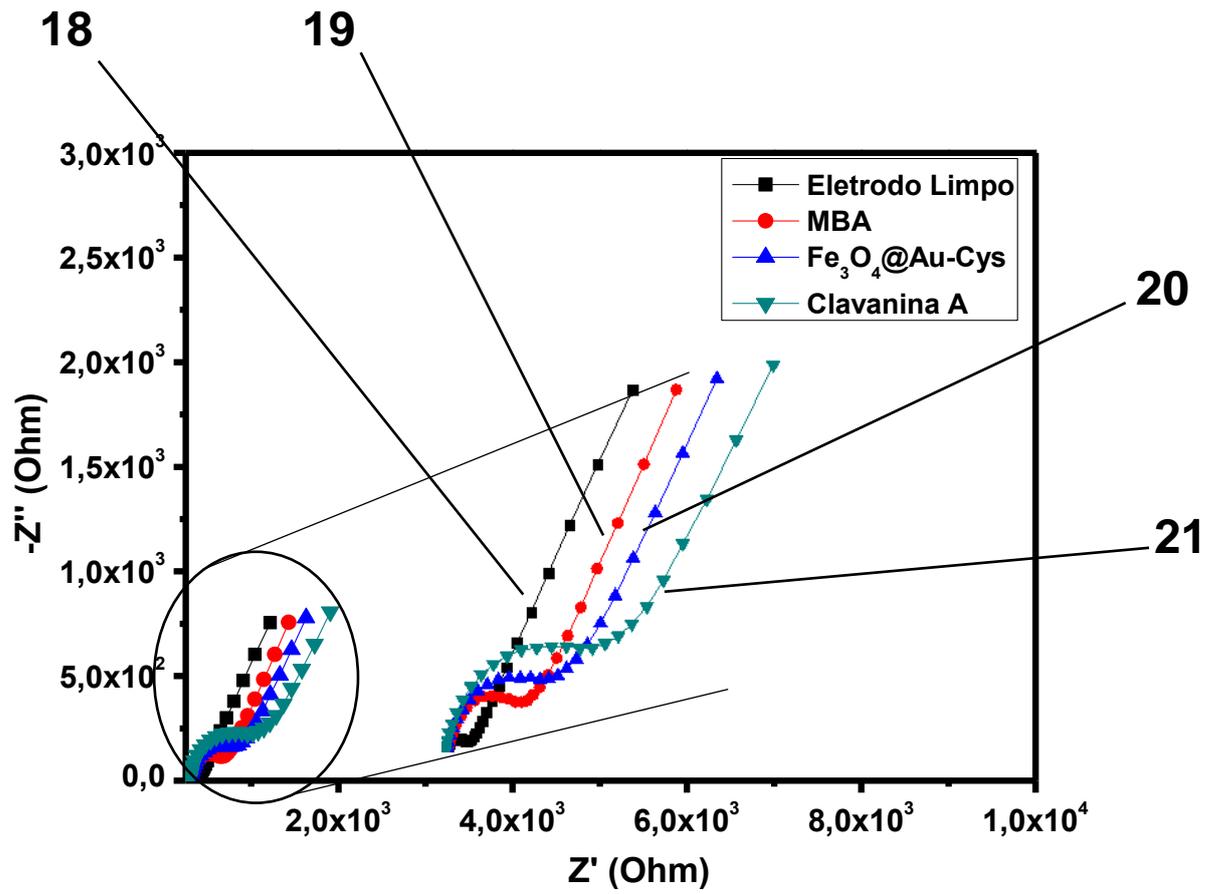


Figura 5

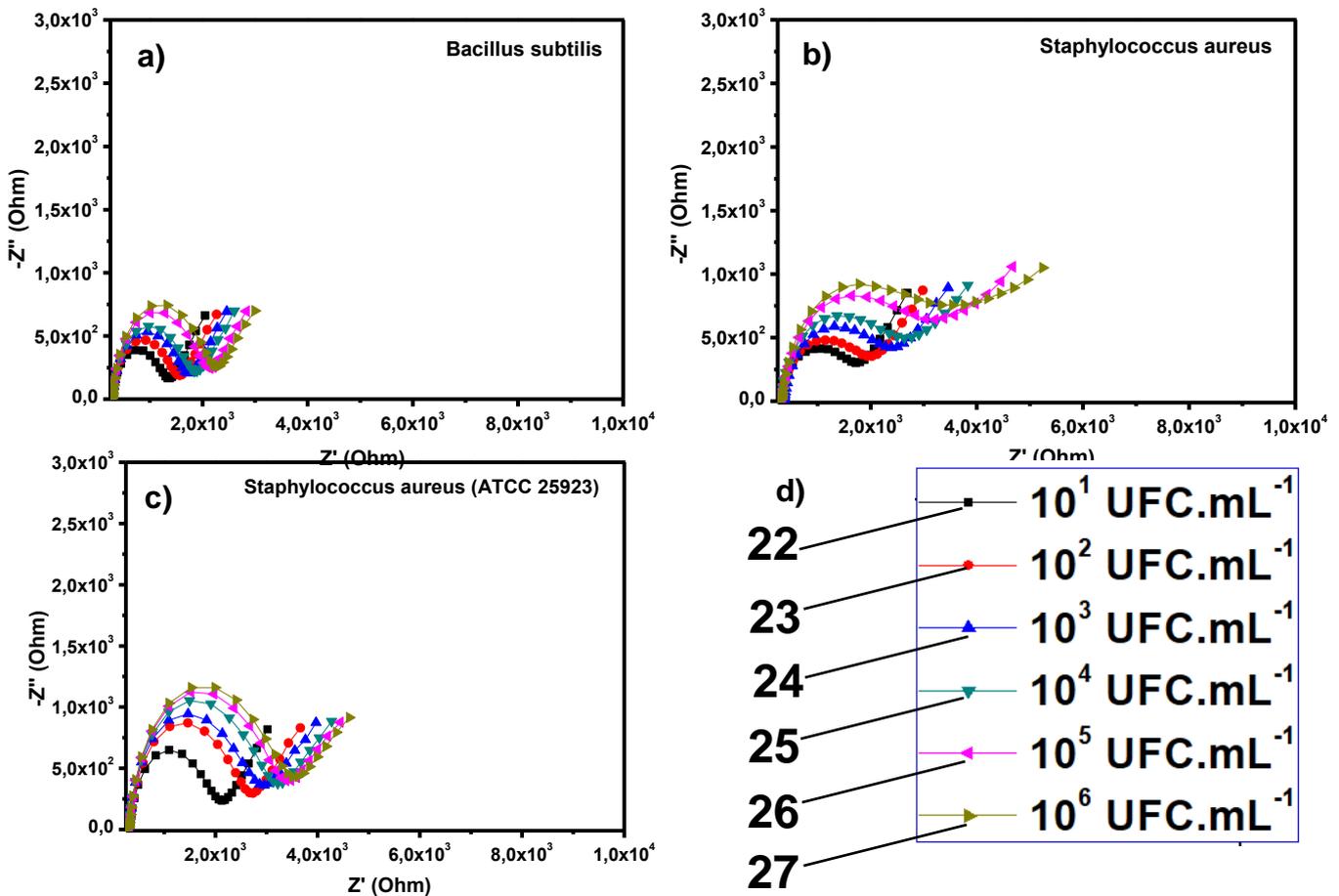


Figura 6

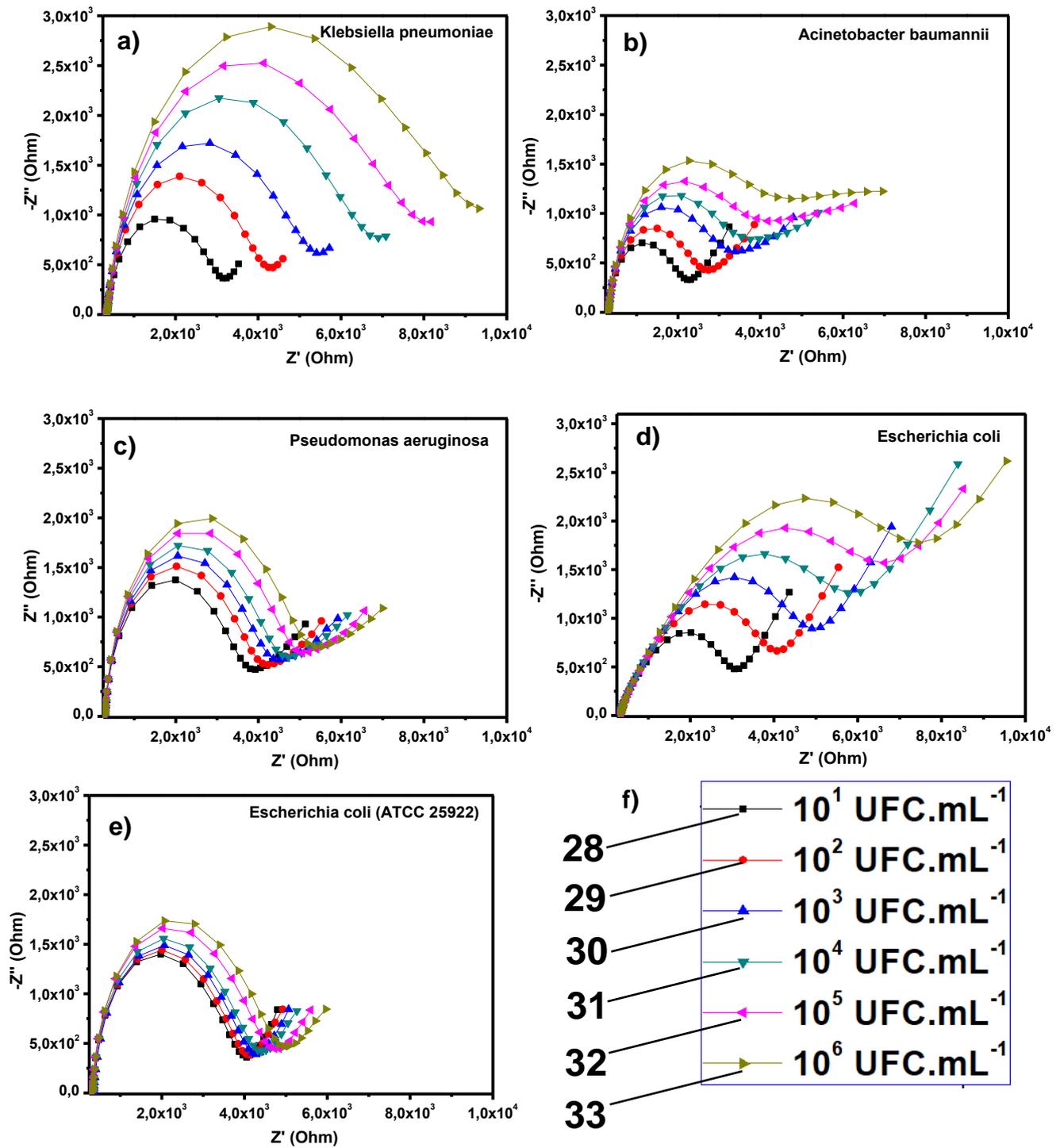


Figura 7

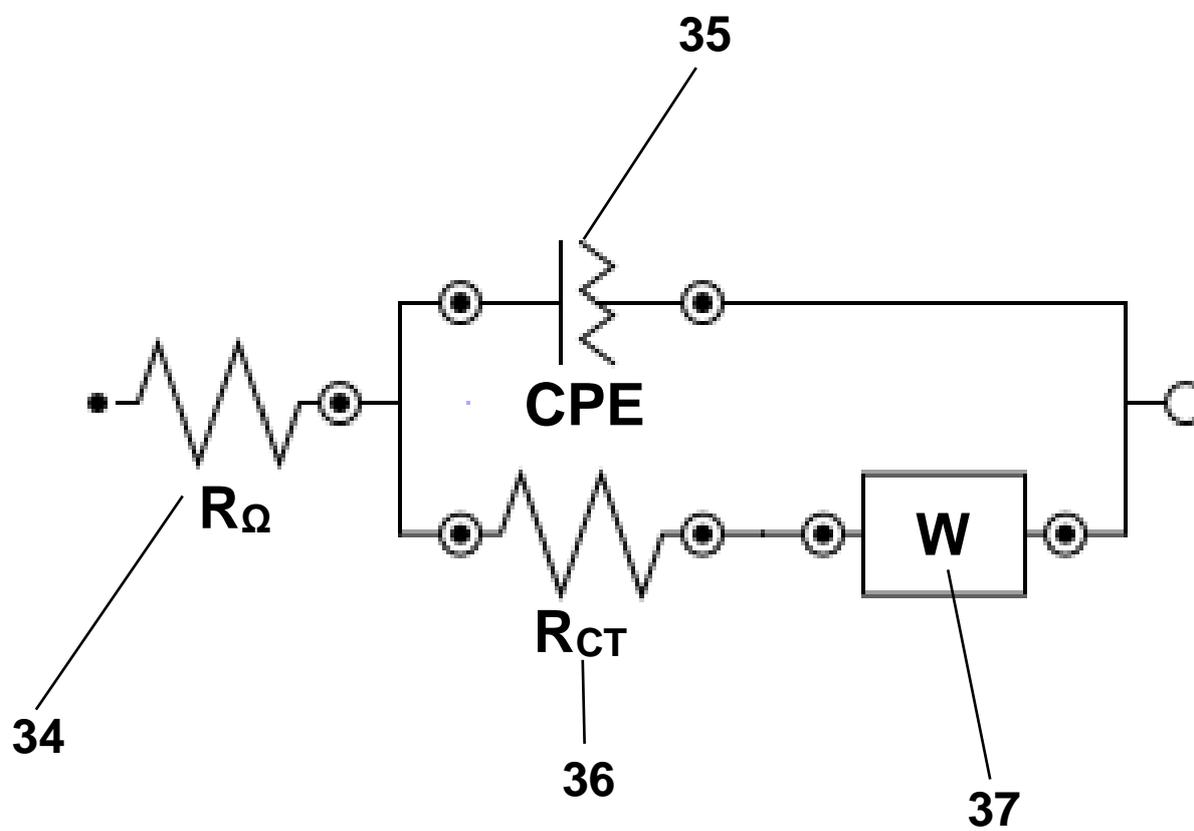


Figura 8

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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 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- $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -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.