



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

(21) BR 102020003934-2 A2



(22) Data do Depósito: 27/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 30/11/2021

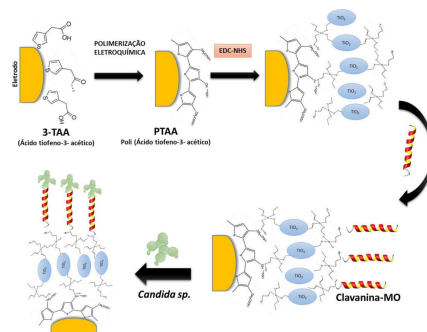
(54) **Título:** NANOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS E USOS

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/543; G01N 33/569; B82Y 15/00; C07K 14/435.

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

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

(57) **Resumo:** NANOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS E USOS. A presente invenção refere-se a métodos e composições para identificação de microrganismos patogênicos, sendo aplicável à área de diagnóstico clínico através do uso de biossensores eletroquímicos nanoestruturados. A invenção baseia-se na aplicação de um peptídeo antimicrobiano, a Clavanina-MO, ligada quimicamente a nanopartículas metálicas de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>NPs) funcionalizadas com aminopropiltrietoxissilano (APTES) adsorvido na superfície do eletrodo de ouro previamente modificado com uma camada de filme de ácido poli-3-tiofeno acético (PTAA). Microorganismos como bactérias e leveduras da espécie *Candida* podem ser identificados por meio do dispositivo aqui apresentado. A composição da parede celular de cada microorganismo avaliado induzirá uma resposta eletroquímica específica após interagir com a Clavanina-MO, elemento de biorreconhecimento da invenção proposta. A interação inicial se dá por interação eletrostática entre a estrutura catiônica do peptídeo com a superfície eletronegativa dos microorganismos, seguida de inserção da Clavanina-MO na membrana celular. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para caracterizar a montagem da plataforma biossensora, bem como avaliar a interação do biossensor desenvolvido com os microorganismos estudados. O sistema sensor apresenta um limite de detecção de 101 UFC (...).



## NANOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGENICOS E USOS

### → Campo técnico

01. A presente invenção refere-se a métodos e composições para identificação de microorganismos patogênicos, sendo aplicável à área de diagnóstico através do uso de biossensores eletroquímicos nanoestruturados. A invenção baseia-se na aplicação de um peptídeo antimicrobiano, a Clavanina-MO, ligado quimicamente a nanopartículas metálicas de óxido de titânio ( $TiO_2Nps$ ) funcionalizadas com aminopropiltriétoxisilano (APTES) adsorvido na superfície do eletrodo de ouro previamente modificado com uma camada de filme de ácido poli-3-tiofeno acético (PTAA) na construção de uma plataforma biossensora capaz de detectar microorganismos patogênicos em amostras com baixas concentrações. Em particular, na presente invenção, foi desenvolvido um biossensor para detecção de fungos do gênero *Candida spp* causadores de candidíases invasivas.

02. O advento da nanotecnologia permitiu o desenvolvimento de ferramentas inovadoras com propriedades singulares que apresentam baixo custo, portabilidade e possibilidade de miniaturização associada ao uso de componentes nanoestruturados, materiais que se destacam pela sua fácil síntese e elevada funcionalidade. Biossensores que fazem uso de nanomateriais como AuNPs, AgNPs,  $TiO_2NPs$ , etc., se destacam pela sua sensibilidade aprimorada e análise em tempo real, promovendo a eficiência na detecção do alvo terapêutico. A introdução de técnicas como a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC), amplamente utilizadas na área de biossensores auxiliam na identificação do biorreconhecimento com um sinal elétrico mensurável

a ser lido na forma de um diagrama de Nyquist e voltamograma cíclico, respectivamente. Nanopartículas de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>NPs) como as usadas no presente trabalho dispõem de características atrativas como biocompatibilidade e elevada razão área-volume, características que possibilitam a integração de moléculas biológicas ativas em sua estrutura, como fragmentos de DNA, enzimas, peptídeos, etc., considerados elementos de biorreconhecimento na área dos biossensores.

03. Ademais, destacamos o desenvolvimento de uma metodologia inovadora de biossensor por ser o primeiro protótipo que faz uso do peptídeo antimicrobiano (AMP) Clavanina-MO, cuja estrutura apresenta a habilidade de identificar e diferenciar diversos microorganismos como fungos do gênero *Candida*.

#### → Estado da técnica

04. Infecções hospitalares (IH) permanecem sendo um problema de saúde pública. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que cerca de 1,4 milhões de pessoas no mundo sofrem algum tipo de infecção no ambiente hospitalar (Nazir; Kadri, 2014).

05. Dentre os microrganismos causadores de IH, fungos do gênero *Candida sp.* têm causado um alarmante impacto na área médica. Apesar de algumas espécies serem simbioses comensais, *Candida sp.* São conhecidos como um dos principais patógenos oportunistas envolvidos em IH. Estudos revelaram que *Candida spp.* destaca-se um dos quatro principais patógenos presentes em infecções da corrente sanguínea (candidemia), juntamente com espécies específicas de estafilococos e *Enterococcus spp.*, permanecendo um dos maiores desafios para entidades clínicas.

06. Entre os casos de infecção fúngica, sete espécies de *Candida* se destacam como causadoras de infecção da corrente sanguínea associada à candidíase invasiva, correspondendo a mais de 95% dos casos de candidemia em nível mundial: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* (Suleyman; Alangaden, 2016). Dentre os fatores que aumentam a predisposição à infecção fúngica, se destacam pacientes submetidos a quimioterapia e antibioticoterapia de amplo espectro, transplantes de órgãos, e principalmente aqueles que fazem uso de cateter venoso central e urinário (Lagunes; Rello, 2016).

07. Os métodos padrões para o isolamento e a identificação de *Candida* em casos de candidíase invasiva e candidemia em cultura de amostras de sangue e de outros fluidos em meios de cultura específicos ou da pesquisa histopatológica. Apesar da grande aplicabilidade, a hemocultura exige tempo para obtenção de resultados. Os conhecidos ensaios bioquímicos e sorológicos, em alguns casos, carecem de especificidade e sensibilidade das espécies. Além disso, também são utilizados os ensaios de base molecular que se destacam por sua sensibilidade aprimorada, mas dependem de equipamentos e reagentes de alto custo. Portanto, notou-se a importância do desenvolvimento de métodos mais rápidos, sensíveis e eficientes na detecção de espécies de *Candida* em casos hospitalares (Mohammadkazemi; Azin; Ashori, 2015).

08. Biossensores eletroquímicos se destacam como uma alternativa inovadora de análise biológica como a detecção de microorganismos patogênicos. Desde o primeiro biossensor criado na década de 50 por Clark e Lyon, inúmeras portas se abriram na área médica diagnóstica (Saleem, 2013). Basicamente, um biossensor é constituído por um elemento sensor biológico ativo que se destaca por ter afinidade com algum analito (ex: fragmentos de DNA, enzimas, peptídeos, etc.), um transdutor físico-químico cujo objetivo é a

conversão da interação elemento sensor/analito em um sinal mensurável (ex: eletroquímico) e um analisador de dados (Grieshaber *et al.*, 2008).

09. Transdutores eletroquímicos apresentam baixo-custo e análise de fácil entendimento, fornecendo informação sobre as reações que ocorrem na interface eletrodo de trabalho/solução eletrolítica (Faridbod; Norouzi; Ganjali, 2015). Técnicas impedimétricas como a EIS são as mais utilizadas. Os valores de resistência a transferência de carga (RCT) são o principal parâmetro de avaliação, o qual após a interação com o analito-alvo, o RCT tende a aumentar proporcionalmente de acordo com a concentração do analito presente na amostra clínica (Lisdat; Schäfer, 2008).

10. Alguns elementos biológicos têm oferecido ampla gama de aplicações inovadoras na pesquisa em saúde, como é o caso dos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Tais peptídeos possuem atividade antimicrobiana de largo espectro, assim como estabilidade e capacidade de ligação semi-seletiva às superfícies celulares de microrganismos, sendo adequados, portanto, para o uso na construção de plataformas biossensoras como elementos de reconhecimento, destacando que não apresentam atividade citotóxica contra células sanguíneas (Peters; Shirliff; Jabrarizk, 2010). Em adição, de acordo com a diferente constituição da parede celular dos microrganismos, AMPs podem se inserir e permeabilizar a membrana microbiana, liberando um sinal elétrico específico a ser detectado pela técnica impedimétrica (Silva Junior *et al.*, 2018).

11. Com base no exposto, novas técnicas de diagnóstico vêm sendo desenvolvidas com o intuito de diagnosticar *Candida sp.* com o objetivo de elaborar metodologias que promovam resultados rápidos e eficientes. A patente US20120156688A1 consiste num biossensor baseado num peptídeo antimicrobiano imobilizado em um componente

sensor que possui um ânodo e um cátodo capaz de se ligar a bactérias, fungos, protozoários e outros alvos.

12. A patente CN109576349A demonstra um nanobiossensor com nanopartículas de ouro que detecta *Candida albicans* a partir da amplificação da temperatura constante. A patente de número CN104076025A fornece um sensor de eletroquimiluminescência que compreende uma camada de L-cisteína, uma camada de nanopartículas de ouro e uma camada de peptídeo antimicrobiano montadas em eletrodo de ouro.

13. Ademais, pode-se citar a patente US10436779B2 que consiste em um biossensor para detectar diferentes patógenos, o qual a detecção é baseada em calorimetria. Este incorpora partículas magnéticas funcionalizadas com um substrato químico específico para que os patógenos sejam detectados. Nenhuma das patentes citadas anteriormente utiliza sistemas de biossensores com dispositivos nanoestruturados baseados em TiO<sub>2</sub>, PTAA e o peptídeo Clavanina-MO em sua composição. Embora tais documentos apresentem semelhança em relação à presente patente, as diferenças existentes podem ser observadas através da comparação de seus componentes, apresentada na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Comparativo entre sensores desenvolvidos para a detecção de microorganismos

|                   | Nanopartículas modificadas | PTAA | Peptídeo antimicrobiano |
|-------------------|----------------------------|------|-------------------------|
| Invenção proposta | Sim                        | Sim  | Sim                     |
| US20120156688A1   | Não                        | Não  | Sim                     |
| CN109576349A      | Não                        | Não  | Não                     |
| CN104076025A      | Sim                        | Não  | Sim                     |
| US10436779B2      | Sim                        | Não  | Não                     |

14. A novidade da presente invenção está na composição da plataforma sensora formada por filmes de PTAA, TiO<sub>2</sub>NPs funcionalizadas com APTES e um novo peptídeo antimicrobiano, a Clavanina-MO (FLPIIVFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHV-NH<sub>2</sub>) nunca antes explorada na construção de biossensores, utilizando a técnica impedimétrica para a biodeteção de microorganismos de interesse clínico.

→ **Problemas do estado da técnica**

15. Apesar de efetivos, os métodos tradicionais são marcados por falso-positivos. Em adição, testes que utilizam meios de cultura líquidos, sólidos e semissólidos exigem de no mínimo 24h a 48h para o crescimento do microorganismo em questão, resultando na demora da aplicação imediata de um medicamento adequado ao paciente (Terato *et al.*, 2014). Denota-se também que abordagens moleculares requerem equipamentos e reagentes de elevado custo (López *et al.*, 2009).

→ **Objetivo da invenção**

16. O objetivo da presente invenção é apresentar um biossensor eletroquímico nanoestruturado com TiO<sub>2</sub>NPs do peptídeo Clavanina-MO. Esta permite a deteção e diferenciação de cândidas patogênicas, podendo ser usada como uma eficiente técnica no diagnóstico de candidemias e candidíase invasiva.

17. Com foco inicial em leveduras da espécie *Candida sp.*, o presente biossensor objetiva a aplicação na biodeteção de microorganismos de uma maneira geral.

18. A deteção dos microorganismos e análise dos resultados se dá por até 10 minutos, utilizando uma pequena quantidade de amostra suspeita de conter o analito alvo (2 µL).

19. O limite de detecção obtido foi de 101 UFC mL<sup>-1</sup>, podendo alcançar até 106 UFC mL<sup>-1</sup>. Ademais, o biossensor proposto apresenta a capacidade de miniaturização por associar a técnica eletroquímica com nanomateriais.

→ **Solução do problema**

20. Como ato inventivo, a presente invenção denota a obtenção de um biossensor eletroquímico constituído com camadas automontadas de filme nanoestruturado de ácido poli-3-tiofeno acético e nanopartículas de óxido de titânio funcionalizado com aminopropiltriétoxisilano que lhe conferiu grupamentos amina à sua superfície, constituindo um sistema eficiente na imobilização de moléculas biológicas, como a Clavanina-MO, a qual completa o biossensor com sua capacidade de interagir com a parede celular de espécies de *Candida* e outros microorganismos. A abordagem inovadora aqui demonstrada provém um diagnóstico rápido e preciso, com obtenção de resultados em um curto período de tempo (~10 minutos).

→ **Vantagens**

21. O dispositivo apresentado na invenção é capaz de detectar, através de técnicas eletroquímicas, carboidratos presentes na superfície da parede celular de fungos do gênero *Candida*, demonstrando sensibilidade e capacidade de diferenciar espécies desse gênero, utilizando um novo peptídeo antimicrobiano como elemento detector, nunca antes utilizado na construção de biossensores.

22. A modificação de superfície por filmes de PTAA, que auxiliam na condução dos elétrons presentes na solução eletrolítica.



23. A construção da plataforma sensora em inúmeras superfícies, com destaque para superfícies metálicas como a de ouro, platina, cobre, etc.

24. Nanopartículas metálicas, sobretudo as  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  que também têm um papel essencial na migração estável dos elétrons, favorecendo e aprimorando a sensibilidade da técnica.

25. Com um limite de detecção de  $101 \text{ UFC mL}^{-1}$ , o biossensor proposto se destaca dentre as demais técnicas disponíveis no ambiente clínico.

26. Fácil síntese e manuseio, permitindo sua aplicação em laboratórios clínicos e centros de pesquisa.

#### → Descrição da invenção

27. 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.

28. Resumidamente, a montagem da plataforma inicia-se, primeiramente, pela polimerização eletroquímica do PTAA no eletrodo de ouro, em seguida a modificação de superfície das  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  com APTES, seguida de sua adição ao eletrodo modificado e posterior acoplamento do peptídeo Clavanina-MO ao sistema sensor.

29. A polimerização do PTAA foi realizada da seguinte forma: inicialmente, o eletrodo do disco de ouro foi polido em lixa com água deionizada. Para uma limpeza completa, permaneceu 30 minutos embebido em  $\text{NaClO}$ , finalmente foi enxaguado com água ultrapura. Posteriormente, 20 mL de uma solução 0,5M de ácido 3-tiofeno acético (3TAA) em  $\text{HCl}$  (0,1M) foram preparados e, em seguida, a polimerização do monômero 3TAA em poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA). O filme PTAA foi preparado por polimerização potencioestática pela técnica de

voltametria cíclica (VC) na superfície do eletrodo de ouro. Através da VC, foram aplicados 40 ciclos de polimerização em uma faixa de potencial de -0,2 a +1,5 V com uma velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>. Finalmente, o filme foi lavado com água deionizada para remover monômeros não absorvidos.

30. A modificação química das NPsTiO<sub>2</sub> consistiu na adição de grupos amino em sua superfície. Para isso, foi utilizado 3-aminopropiltrióxissilano (APTES) via reação de co-condensação. Para isso, 0,5g de TiO<sub>2</sub>NPs (óxido de titânio IV) foram dispersos em aproximadamente 50 mL de DMSO. A dispersão foi submetida a um banho ultrassônico durante cerca de 1 hora. Subsequentemente, 400 µL de APTS foram adicionados à solução que permaneceu durante a noite sob agitação. Finalmente, a solução foi lavada com metanol para remover o excesso de APTES e, após filtração, seco a 60°C em estufa. O peptídeo antimicrobiano Clavanina-MO é dissolvido em água deionizada ultrapura numa concentração entre 100-500 µM.

31. A construção do biossensor segue as seguintes etapas: (1) após o processo de polimerização do 3TAA (1), para ativar os grupamentos carboxílicos livres do filme de PTAA e acoplamento dos grupos amino seguintes, foi aplicado 2µL de EDC:NHS; (2) após 2 minutos de incubação, 2µL da solução de TiO<sub>2</sub>NPs-APTES foram aplicados no eletrodo modificado, e, 10 minutos depois, o EDC:NHS foi novamente adicionado para ativar os grupos amino livres presentes na superfície das TiO<sub>2</sub>NPs; (3) o eletrodo previamente modificado por PTAA\_EDC:NHS\_TiO<sub>2</sub>NPs\_EDC:NHS foi submetido a 2µL de solução de Clavanina-MO por 10 minutos; (4) por fim, 2µL de solução contendo diferentes concentrações (10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* foram incubadas na superfície do eletrodo modificado por 10 minutos, seguida da análise eletroquímica.

32. A caracterização de construção da plataforma biossensora e caracterização da detecção dos analitos-alvo foi realizada por meio da técnica eletroquímica. Análises impedimétricas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N (Ecochemie, Metrohm Autolab, The Netherlands) conectado a um *software* controlado e por um computador. Os espectros de impedância foram registrados na faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz com um potencial de onda senoidal de 10 mV. Todas as medições foram realizadas em um sistema convencional de três eletrodos: um eletrodo com superfície de ouro foi utilizado como eletrodo de trabalho, o eletrodo de fio de platina como contraeletrodo e o de Ag/AgCl como eletrodo de referência, todos imersos numa solução de 10 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  (1:1) em PBS pH 7,4, usada como sonda redox. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas a  $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , dentro de uma gaiola de Faraday.

#### → Listagem e descrição de figuras

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

34. Na Figura 1 temos uma representação esquemática da montagem da plataforma biossensora, o qual se inicia com a eletropolimerização do 3TAA em filmes de PTAA, seguindo a ativação dos grupos carboxílicos livres com o EDC:NHS, e finaliza-se com a ligação covalente do PAM Clavanina-MO, deixando o sensor apto para o biorreconhecimento dos analitos.

35. Na Figura 2 observa-se o voltamograma cíclico referente à eletrodeposição do 3TAA em filmes de PTAA. Observa-se o pico de oxidação crescente em 1,3 V, indicando o crescimento do filme de PTAA na superfície de ouro do eletrodo de trabalho.

36. Na Figura 3 temos a avaliação eletroquímica da montagem da plataforma biossensora por meio da espectroscopia de impedância eletroquímica. Como descrito na tabela interna, o espectro preto refere-se ao eletrodo limpo. O filme de PTAA é caracterizado pelo espectro vermelho. A associação das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  funcionalizadas ao filme de PTAA aumentou a resistência à transferência de carga, dando origem ao espectro em azul. Por fim, a ligação do C-terminal do peptídeo Clavanina-MO à amina livre na  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  resultou no aumento do RCT com o bloqueio da passagem da corrente de elétrons da sonda redox ao eletrodo, resultando no espectro de cor verde.

37. Por fim, na Figura 4 temos a resposta impedimétrica do biossensor frente às diferentes espécies de *Candida* em diferentes concentrações: a) *C. albicans*, b) *C. glabrata*, c) *C. tropicalis* e d) *C. krusei*. Foi possível avaliar por meio das respostas demonstradas nos diagramas de Nyquist o aumento do diâmetro do semicírculo de forma gradual, demonstrando um aumento consecutivo com o aumento da concentração da amostra biológica testada ( $10^1$  a  $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), evidenciando que quando aplicado o potencial sobre o eletrodo de trabalho, há um maior impedimento na passagem da corrente de elétrons. Além disso, o biossensor respondeu de formas diferentes para cada tipo de *Candida*, indicando que o dispositivo é capaz de diferenciar as espécies de acordo com sua interação com carboidratos presentes na parede celular do fungo analisado.

#### → Referências

38. 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, 137-186, 2015.

39. Grieshaber, D. *et al.* **Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures**. *Journal Of Applied Biomedicine*, January, 57-64, 2008.

40. Lagunes, L.; Rello, J. **Invasive candidiasis: from mycobiome to infection, therapy, and prevention**. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(8):1221-1226, 2016.

41. Lisdat, F.; Schäfer, D. **The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5):1555-1567, 2008.

42. 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*, 11(1):13-46, 2009.

43. Mohammadkazemi, F.; Azin, M.; Ashori, A. **Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media**. *Carbohydrate Polymers*, 117:518-523, 2015.

44. Nazir, A.; Kadri, S. **An overview of hospital acquired infections and the role of the microbiology laboratory**. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 2(1):21, 2014.

45. Peters, B. M.; Shirtliff, M. E.; Jabra-Rizk, M. A. **Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs?** *PLoS Pathogens*, 6(10):4-7, 2010.

46. Saleem, M. **Biosensors: a promising future in measurements**. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 51, 2013.

47. Silva Junior, A. G. *et al.* **A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin A peptide for bacterial detection**. *Sensors and Actuators, B. Chemical*, 255:3267-3274, 2018.

48. Suleyman, G.; Alangaden, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(4):1023-1052, 2016.

49. Terato, K. *et al.* Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to reinvestigate antibody studies in autoimmune diseases. *Journal of Immunological Methods*, 407:15-25, 2014.

## REIVINDICAÇÕES

- 1) Biossensor eletroquímico, configurado para a detecção de microrganismos, **caracterizado por:** (a) suporte para imobilização das moléculas; (b) fonte de corrente elétrica; (c) uma camada de filme de ácido poli-3-tiofeno acético (PTAA); (d) nanopartículas metálicas de óxido de titânio aminadas (TiO<sub>2</sub>NPs); (e) molécula de reconhecimento (Clavanina-MO).
- 2) Biossensor eletroquímico, conforme Reivindicação 1, **caracterizado por** terem eletrodos conectados a um potenciostato e circuito para medida da impedância.
- 3) Biossensor eletroquímico, conforme Reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** sistema preferível com três eletrodos.
- 4) Biossensor eletroquímico, conforme Reivindicação 3, **caracterizado pelos** três eletrodos serem um eletrodo de trabalho com superfície preferivelmente metálica, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um contra-eletrodo de platina.
- 5) Método para obtenção do biossensor eletroquímico da Reivindicação 1, **caracterizado por:** (a) superfície de suporte preferivelmente de ouro, objetivando uma maior condutibilidade elétrica e biocompatibilidade ao dispositivo facilitando interações moleculares; (b) formação de filme de PTAA preferivelmente executada por meio da voltametria cíclica na presença de HCl e 40 ciclos voltamétricos; (c) TiO<sub>2</sub>NPs funcionalizadas com aminopropiltriétoxisilano (APTES) para obtenção superficial de grupos amino (-NH<sub>2</sub>) úteis na interação com grupos carboxílicos do filme de PTAA; (d) adsorção de peptídeo antimicrobiano Clavanina-MO, molécula de biorreconhecimento.
- 6) Método para caracterização de montagem do biossensor eletroquímico da Reivindicação 1, **caracterizado por** possuir as etapas: (a) imersão dos três eletrodos em uma solução de 10 mM

ferro/ferricianeto de potássio em tampão fosfato de pH 7,4; (b) aplicação da técnica eletroquímica 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 biossensor eletroquímico da Reivindicação 1, **caracterizado por** possuir as etapas: (a) aplicar a amostra líquida suspeita de conter microorganismos de interesse clínico à superfície do biossensor montado; (b) tempo de adsorção da amostra contendo analito-alvo de 10 minutos; (c) inserção do eletrodo contendo o biossensor após interação com amostra biológica na célula eletroquímica; (d) análise impedimétrica da resposta do biossensor frente aos microorganismos suspeitos seguindo os mesmos parâmetros observados na Reivindicação 6; (e) avaliação dos espectros de impedância obtidos após interação com a amostra contendo microorganismos, adquirindo os valores da resistência à transferência de carga (RCT) através da variação do diâmetro do semicírculo alcançado na análise.

8) Uso do biossensor eletroquímico da Reivindicação 1, **caracterizado pelos** analitos-alvo serem microorganismos, compreendendo principalmente fungos do tipo leveduras do gênero *Candida*, além de bactérias e protozoários.



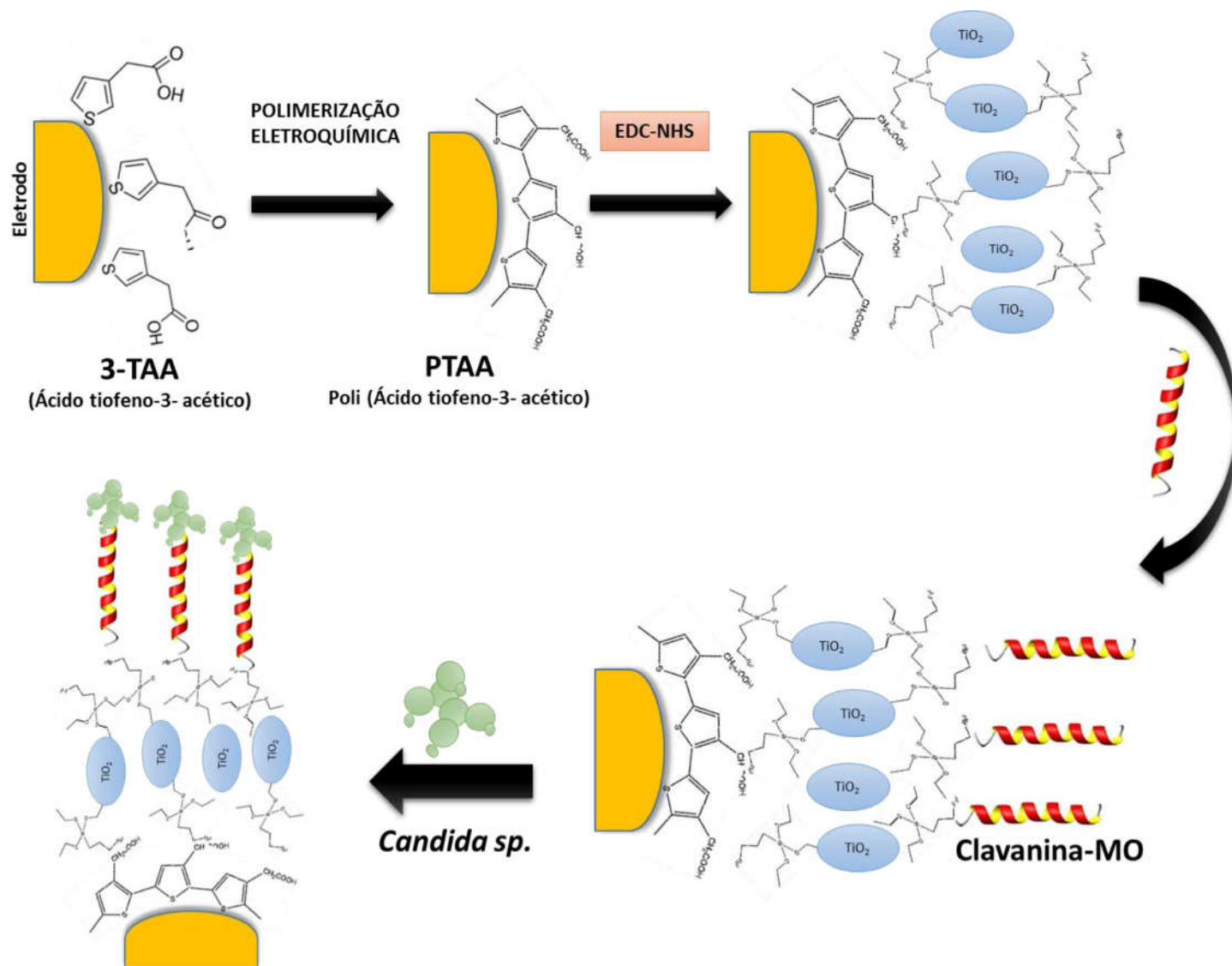


Figura 1

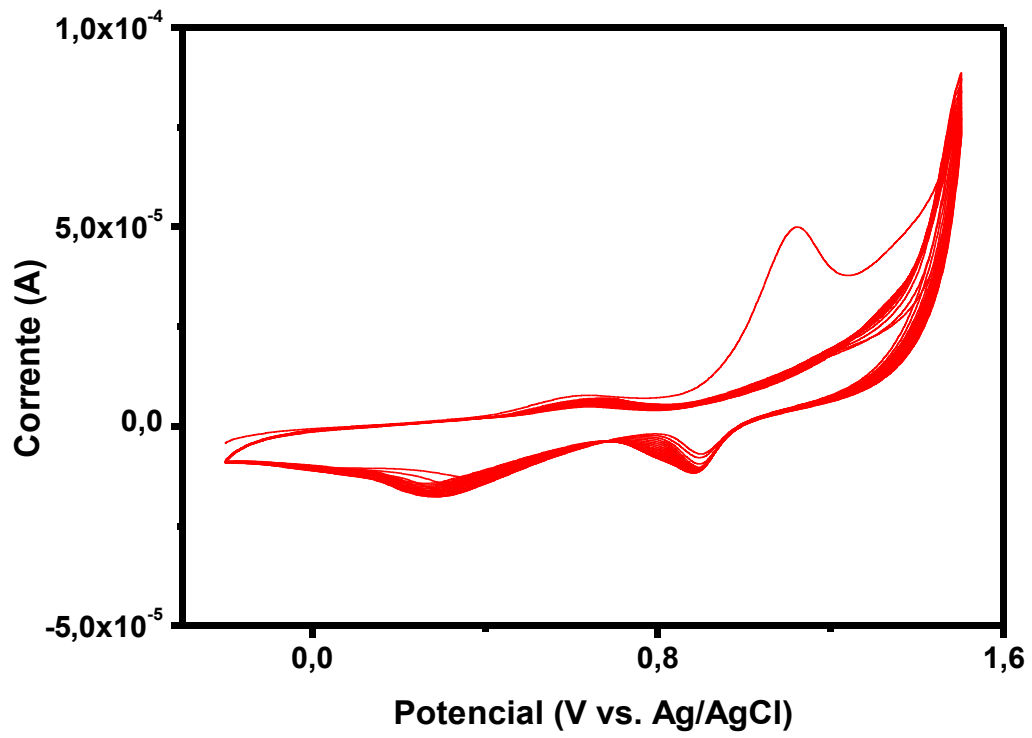


Figura 2

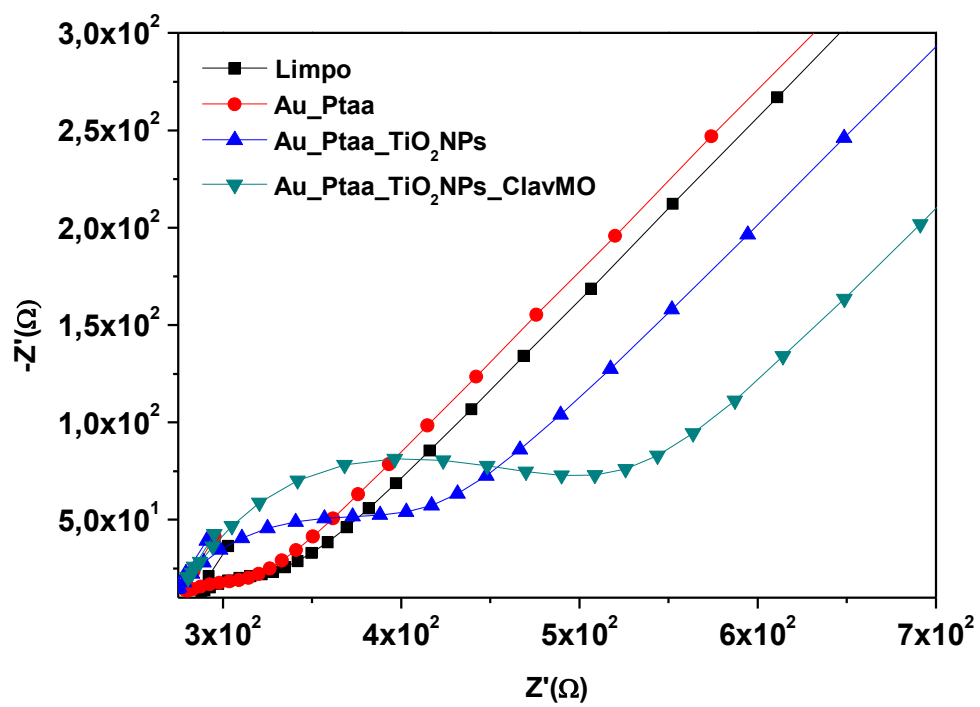


Figura 3

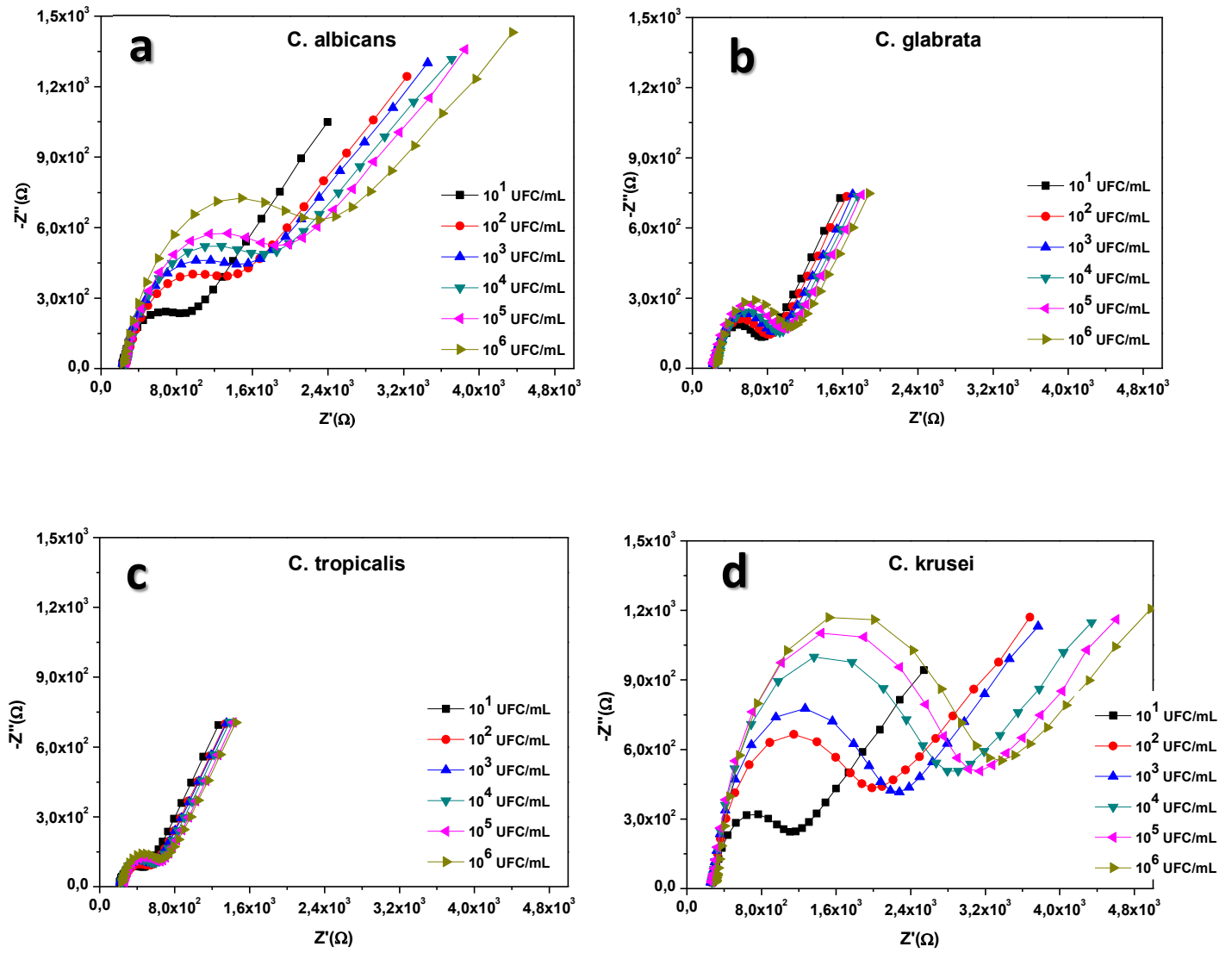


Figura 4

**RESUMO****NANOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGENICOS E USOS**

A presente invenção refere-se a métodos e composições para identificação de microrganismos patogênicos, sendo aplicável à área de diagnóstico clínico através do uso de biossensores eletroquímicos nanoestruturados. Baseia-se na aplicação de um peptídeo antimicrobiano, a Clavanina-MO, ligada quimicamente a TiO<sub>2</sub>NPs funcionalizadas com APTES adsorvido na superfície do eletrodo de ouro previamente modificado com uma camada de filme de PTAA. Microorganismos como bactérias e leveduras da espécie *Candida* podem ser identificados por meio do dispositivo aqui apresentado. A composição da parede celular de cada microorganismo avaliado induzirá uma resposta eletroquímica específica após interagir com a Clavanina-MO, elemento de biorreconhecimento da invenção proposta. A interação inicial se dá por interação eletrostática entre a estrutura catiônica do peptídeo com a superfície eletronegativa dos microorganismos, seguida de inserção da Clavanina-MO na membrana celular. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para caracterizar a montagem da plataforma biossensora, bem como avaliar a interação do biossensor desenvolvido com os microorganismos estudados. O sistema sensor tem limite de detecção de 101 UFC mL<sup>-1</sup>.