



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

(21) BR 102020026059-6 A2



(22) Data do Depósito: 18/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 05/07/2022

(54) **Título:** BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS

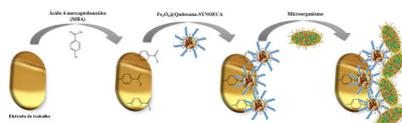
(51) **Int. Cl.:** G01N 33/569; G01N 27/327; G01N 33/18; G01N 33/543; C12M 1/34; (...).

(52) **CPC:** G01N 33/569; G01N 27/327; G01N 33/18; G01N 33/5438; G01N 2333/005; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FUB; UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO - UCDB; UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO CATÓLICA - UBEC.

(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; MÁRCIA RENATA MORTARI; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE.

(57) **Resumo:** BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS. A invenção aqui descrita refere-se a um biossensor eletroquímico baseado em novo peptídeo antimicrobiano para a rápida e sensível detecção de microorganismos de interesse clínico. Sua composição nanoestruturada agrega monocamada automontada de ácido 4-mercaptopbenzóico (MBA), ligadas fortemente ao ouro do eletrodo de trabalho por meio de interações sulfidríla-ouro. Nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana ($Fe_3O_4@Q$) foram utilizadas para melhor migração da corrente elétrica e ancoragem ao peptídeo antimicrobiano synoeca-MP, elemento de biorreconhecimento para a identificação e diferenciação de bactérias e fungos presentes em amostras líquidas. A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizada para análise do processo de montagem da plataforma biossensora, bem como determinar a detecção dos analitos-alvo. O sistema apresentado se destaca diante dos métodos tradicionais por dispor de análise rápida (5-10 minutos), limite de detecção de 10^1 a 10^5 UFC.mL⁻¹ e elevado potencial de miniaturização.



BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS

→ Campo da invenção

1. A invenção em questão trata de uma inovadora plataforma biossensora para a identificação de microrganismos patogênicos. A invenção consiste na administração de um peptídeo antimicrobiano (PAM) isolado do veneno da vespa social *Synoeca surinama*, o synoeca-MP, à superfície de nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana, um polímero natural, sendo estas imobilizadas à superfície de um substrato metálico, como o ouro presente em eletrodos usados em estudos eletroquímicos. Tal invenção proposta dispõe de grande potencial de mercado e uso na vida diária para a detecção de patógenos presentes em água contaminada ou em amostras biológicas.

2. A conexão entre biomoléculas e nanoestruturas é um recurso promissor para a expansão da área biomédica voltada à criação de biodispositivos sensores. Materiais nanoestruturados, como as nanopartículas magnéticas revestidas pelo polímero quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Quit}$), possuem características físico-químicas únicas e extremamente úteis, voltadas para o auxílio no tratamento de doenças, bem como no diagnóstico, sobretudo quando associadas a biossensores. Em adição, tais nanopartículas apresentam uma resposta eletroquímica favorável à migração de elétrons, sendo facilmente administrada por meio de técnicas eletroquímicas, como a voltametria cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), também amplamente exploradas na avaliação de biossensores.

3. O peptídeo do presente projeto apresenta uma estrutura de resíduos de aminoácidos inovadora ($\text{INWLKLGKKIIASL-NH}_2$), sendo esta a primeira proposta a explorar sua atividade com objetivos diagnósticos.

Sua associação a nanoestruturas ostenta múltiplas finalidades, visando o uso como agentes antimicrobianos e como elementos sensores de microrganismos, sendo esta segunda colocação explorada na presente invenção. Em adição, sua estrutura permite a integração em dispositivos sensores que podem ser facilmente miniaturizados.

→ **Fundamentos da invenção**

4. A água, elemento indispensável à vida, encontra um problema crescente a nível mundial: a água disponível é muito salina ou considerada apta para consumo, se torna inútil devido à poluição desencadeada pelos seres humanos.

5. Em virtude do fenômeno do crescimento populacional, torna-se maior a necessidade da produção de materiais e serviços, cujo uso da água se torna indispensável, aumentando seu consumo a nível doméstico e a nível industrial, percorrendo áreas como a agricultura, piscicultura, recreação aquática e a manutenção de ecossistemas.

6. Pode-se destacar alguns tipos de patógenos como os mais presentes em casos de doenças desencadeadas por água contaminada, onde bactérias e outros microrganismos ocasionam a maioria dos casos, com cerca de 57% dos agentes etiológicos encontrados, quando comparado com parasitas (19%) e vírus (7%) (Saxena, 2020).

7. Intoxicação alimentar é outro ponto alarmante quanto à saúde humana. A presença direta de microrganismos, bem como das toxinas produzidas por bactérias e fungos em alimentos sólidos e líquidos, são responsáveis por milhões de casos de intoxicação ao redor do mundo. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que, anualmente, cerca de 600 milhões de pessoas são acometidas por doenças ou intoxicações causadas por microrganismos presentes em alimentos contaminados (Asia, 2016).

8. Bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos também estão presentes em infecções nosocomiais. Tais microrganismos permanecem um problema de saúde pública devido ao persistente obstáculo da resistência a antimicrobianos. Dentre as Gram-positivas, pode-se destacar a patogenicidade do *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, sendo responsáveis principalmente por infecções pulmonares, infecções das valvas cardíacas e da corrente sanguínea (Bereket *et al.*, 2012; Calfee *et al.*, 2014; Puchter *et al.*, 2018).

9. As bactérias Gram-negativas são as responsáveis pelos casos mais graves de infecções no ambiente hospitalar, onde microrganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Acinetobacter baumannii* se destacam por colonizarem áreas onde ocorrem a inserção de cateteres e cânulas, além de estarem presentes em infecções no sítio cirúrgico (Macvane, 2016; Mehrad *et al.*, 2015; Perez *et al.*, 2010).

10. O diagnóstico rápido e efetivo desses microrganismos se torna crucial visando a administração imediata e efetiva do recurso terapêutico mais adequado, resultando na menor permanência no ambiente hospitalar. Tais ações reduzem os riscos de contaminação por outros patógenos, bem como a redução dos gastos públicos e próprios para o tratamento.

11. O diagnóstico presuntivo de bactérias e fungos tem como método principal os meios de cultura sólidos e semissólidos. Apesar de indicar o crescimento microbiano, esses meios de cultura trazem um diagnóstico parcial para determinado microrganismo específico, uma vez que muitos meios de cultura são específicos para apenas uma espécie, seja ela bacteriana ou fúngica. Em adição, um amplo período de tempo é necessário para se obter o crescimento do microrganismo, levando de 24 a 72h após o semeio (López *et al.*, 2009).

12. Se tratando de métodos imunoenzimáticos, destacam-se os ensaios por imunoabsorção enzimática, como o teste ELISA, os quais, apesar de efetivos, os resultados falso-positivos são frequentes (Terato *et al.*, 2014). Os testes moleculares se destacam devido a sua especificidade, porém, o elevado custo de equipamentos e reagentes, bem como o tratamento dispendioso da amostra para que ocorra a reação de forma adequada, limitam seu uso principalmente no ambiente hospitalar (Gadsby *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2006).

13. Se destacando como alternativa inovadora para detecção e diferenciação de microrganismos, os biossensores eletroquímicos têm ganho espaço no ambiente acadêmico e hospitalar. O primeiro protótipo, desenvolvido por Clark e Lyons, um biossensor enzimático para detecção de glicose, fomentou a possibilidade de detecção de diferentes analitos (Punia; Singh, 2017).

14. Um biossensor é composto basicamente por: 1) um elemento sensor biológico ativo (podendo ser, por exemplo, uma enzima, anticorpo, fragmento de DNA ou RNA, peptídeos, etc.), exercendo a função de identificar um analito-alvo; e 2) um transdutor físico-químico com função de converter a interação analito-elemento sensor em um sinal elétrico mensurável, sendo este proporcional à concentração do analito presente na amostra (Ensafi, 2019; Grieshaber *et al.*, 2008).

15. Uma ampla variedade de transdutores podem ser utilizados no desenvolvimento de biossensores, onde se destacam os ópticos (absorbância, luminescência, etc.), acústicos (piezoelétrico), termométricos e eletroquímicos (Punia; Singh, 2017). Dentre os citados, os biossensores eletroquímicos são os mais explorados por permitirem a elaboração de dispositivos miniaturizados, portáteis e de baixo custo, associando tais características à rápida e sensível detecção de múltiplos analitos (Hammond *et al.*, 2016; Maduraiveeran; Sasidharan; Ganesan, 2018).

16. Inicialmente explorado como alternativa contra o crescente problema da resistência a antibióticos, os peptídeos antimicrobianos (PAM) dispuseram de inovadoras aplicações, sendo uma delas a área diagnóstica. Tais peptídeos assumem uma conformação anfipática útil na interação com membranas celulares, como as dos microrganismos (Nguyen; Haney; Vogel, 2011). Em adição, é importante ressaltar que os PAM dispõem de elevada seletividade para células microbianas, demonstrando baixa toxicidade a células de mamíferos (Peters; Shirtliff; Jabra-Rizk, 2010). Esta característica torna esses peptídeos úteis em testes de detecção de microrganismos em amostras sanguíneas, como observado em casos de bacteremia.

17. Podendo ser isolado de vários organismos de diferentes origens (mamíferos, peixes, insetos, plantas, microrganismos, etc.), os PAM apresentam uma estrutura de 10-50 aminoácidos (Hancock; Sahl, 2006). O PAM da presente proposta, o synoeca-MP, é isolado do veneno da vespa social *Synoeca surinama*, contendo 14 aminoácidos em sua estrutura (INWLKLGKKIIASL-NH₂). Estudos iniciais com o synoeca-MP evidenciaram a efetividade do peptídeo contra diferentes cepas de microrganismos, como *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Dantas *et al.*, 2019).

→ Estado da técnica

18. Visando a elaboração de metodologias efetivas na detecção de microrganismos, alguns estudos foram realizados. A patente US 8652311 B1 se refere a uma técnica de imunoensaio com medidas amperométricas para detecção de microrganismos. Na referida invenção, uma membrana condutora é utilizada em um eletrodo de carbono. Os testes tiveram foco nas bactérias *Escherichia coli* O157R7 e *Staphylococcus* sp., além de hantavírus.

19. Outro estudo eletroquímico para detecção de microrganismos se refere ao descrito na patente US 7763426 B2. O alvo principal se trata da bactéria Gram-negativa *E. coli*, fazendo uso de um oligonucleotídeo (rRNA 16S bacteriano) que leva à hibridização da sequência do ácido nucleico alvo a ser detectado.

20. A patente WO 2013 034688 A1 trata de um biossensor com superfície modificada para a detecção de múltiplos alvos, utilizando da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. O biossensor aqui desenvolvido é composto por múltiplas camadas, sendo a primeira, de uma camada não-condutora, e a segunda, de um polímero condutor, como a polianilina, poli-3,4-etilenodioxitiofeno e polipirrol, dentre outros. Aqui, apesar de citar uso na detecção de microrganismos, não destaca algum em específico.

21. Ademais, pode-se citar a patente WO 2016 038351, que destaca um biossensor para detecção de bactérias resistentes a antimicrobianos, fazendo uso de uma sonda de DNA específica, o DNA plasmidial *blaNDM*. Tal gene codifica o “New Dheli metalo-betalactamase” e suas variantes. O estudo indica que tal gene é presente na *E. coli*, *Klebsiella sp.* e em microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, sendo, portanto, seus principais alvos de detecção. Em adição, a técnica impedimétrica foi a de escolha para avaliar o biorreconhecimento.

22. Outro estudo envolvendo biossensores bacterianos foi desenvolvido na patente WO 2005 067425 A2, se tratando de um biossensor potenciométrico para detecção de esporos bacterianos. O eletrodo de trabalho escolhido foi o de óxido de índio e estanho (ITO). O biossensor teve, como elemento sensor, peptídeos específicos para interagirem com esporos de *Bacillus subtilis* e *Bacillus anthracis Sterne*, sendo, portanto, seus alvos de detecção. Os peptídeos foram

imobilizados ao eletrodo de trabalho pela técnica da imobilização de monocamada de polissiloxilano.

23. Além do supracitado, as patentes US 2005 0059105 A1 e BR 10 2019 012453 9 descrevem um método e dispositivo biossensor impedimétrico para detecção de microrganismos em solução. O primeiro estudo foi realizado em eletrodos interdigitados, enquanto que o segundo foi conduzido em eletrodo com superfície de ouro, ambos utilizando as mudanças na impedância do sistema para avaliar a detecção do sensor. O elemento sensor de escolha do primeiro foram anticorpos, sem especificar o tipo e qual microrganismo alvo, enquanto que, do segundo estudo citado, teve uso o peptídeo Clavanina A. A patente envolvendo o uso de anticorpos não explorou o uso de nanopartículas, enquanto que o trabalho com peptídeo envolveu o uso de nanopartículas magnéticas, sendo as mesmas revestidas com ouro e o aminoácido cisteína.

24. Verifica-se, portanto, que a presente invenção se diferencia das anteriormente citadas pelo fato de ser a única que une uma estrutura de MBA, podendo ser montada em superfície metálica, como ouro, ou superfícies como a de eletrodo de carbono vítreo, nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana, tendo, como elemento sensor biológico ativo, o novo peptídeo antimicrobiano synoeca-MP para identificação de múltiplos alvos, destacando as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, além dos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

→ Breve descrição dos desenhos

25. A Figura 1 apresenta um esquema do método de construção da plataforma biossensora.

26. A Figura 2 apresenta a caracterização eletroquímica do processo de montagem do biossensor no eletrodo de trabalho, sendo conduzida uma análise voltamétrica (a) e impedimétrica (b).

27. A Figura 3 representa graficamente os espectros de impedância do biossensor eletroquímico, frente às espécies de microrganismos em diferentes concentrações, em que (a) refere-se à *Klebsiella pneumoniae*, (b) *Pseudomonas aeruginosa*, (c) *Bacillus subtilis*, (d) *Enterococcus faecalis*, (e) *Candida albicans* e (f) *Candida tropicalis*.

→ Descrição da invenção

28. De início, houve a síntese das nanopartículas magnéticas, seguindo com o revestimento pela quitosana, polímero natural que favoreceu a presença de grupamentos amina livres em sua superfície.

29. A síntese das nanopartículas revestidas por quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$) foi realizada pelo método da co-precipitação. Sais de ferro foram utilizados, mais precisamente o cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), em concentrações específicas. O peptídeo synoeca-MP foi ancorado à superfície das nanopartículas, a partir da ligação favorecida pelo glutaraldeído, unindo o grupamento amina livre da quitosana que reveste a nanopartícula magnética e o grupo amina da extremidade N-terminal do peptídeo.

30. Adicionalmente, o peptídeo antimicrobiano synoeca-MP é o elemento chave da presente invenção, uma vez que tal peptídeo agirá diretamente na detecção e diferenciação dos microrganismos de interesse clínico, sendo este o primeiro protótipo a utilizar do synoeca-MP para uso na área de diagnósticos.

31. Em adição, a invenção proposta refere-se a um biossensor eletroquímico com avaliação a partir da técnica de espectroscopia de

impedância eletroquímica, para a detecção de múltiplos microrganismos, com foco em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Este biossensor compreende o uso de três eletrodos independentes entre si: eletrodo auxiliar, eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, sendo este último o local de montagem da plataforma sensora nanoestruturada, conforme processo descrito na presente redação.

→ **Exemplos de concretizações da invenção**

32. A invenção aqui descrita propõe a montagem e uso de um novo sistema biossensor para detecção de microrganismos, apresentando fácil síntese e manuseio. Os elementos que compõem a plataforma sensora conferem notável sensibilidade na detecção do analito-alvo, destacando sua efetividade quando comparado com os métodos tradicionais de detecção e identificação microbiana.

33. A síntese das nanoestruturas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Q$ foi realizada pelo método da co-precipitação. Em um béquer, 50-100mL de água deionizada, obtida por um sistema MilliQ, é misturada, sob o auxílio de agitador magnético, a cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), na concentração variável de 0,05 a 0,2M, e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), na concentração de 0,01 a 0,1M. Após 10-30min de agitação, uma solução de quitosana é adicionada à suspensão, sendo subsequentemente submetida a aquecimento sob agitação magnética. As etapas subsequentes são caracterizadas pela adição de hidróxido de amônia 20% (NH_4OH), resultando na mudança da cor da solução de marrom-escuro para preta. Tal particularidade é indicativo da obtenção das nanopartículas magnéticas, a magnetita (Fe_3O_4). As mesmas foram lavadas, com auxílio de campo magnético, em água e etanol 90%, até a suspensão com nanopartículas atingir pH 7. O recobrimento por

quitosana é percebido imediatamente após as inúmeras lavagens em água e etanol, pois se o polímero não estiver presente revestindo a nanopartícula, a solução adquire uma coloração amarronzada. Essa coloração é indicativa de oxidação das nanopartículas, o qual com a cobertura da quitosana, a oxidação é limitada, resultando em uma solução límpida após a “pesca” das nanoestruturas.

34. O recobrimento da nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ com o peptídeo synoeca-MP foi realizado utilizando glutaraldeído, preferencialmente 10%. Cerca de 100mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ são colocadas em um béquer contendo 50-100mL de glutaraldeído. Para dispersão das nanopartículas, o béquer é mergulhado em banho ultrassônico durante 1-3h, preferencialmente 2h. Em seguida, submetido à agitação magnética por 6h. Após o período determinado, as nanopartículas são lavadas três vezes com água deionizada para remoção do glutaraldeído não ligado às $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$. Em seguida, o peptídeo synoeca-MP é diluído na concentração de 0,5-2mg/mL de água deionizada, preferencialmente 1mg/mL. As nanopartículas funcionalizadas pelo glutaraldeído são adicionadas à suspensão peptídica. Posteriormente, a suspensão peptídeo-nanopartículas é submetida a banho ultrassônico por 2h e, em seguida, homogenizada sob agitação magnética durante 24h. Por fim, as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Quit}$ -synoeca são lavadas com água deionizada para remoção do synoeca-MP livre na solução, e ressuspensas em 5mL de tampão fosfato com pH preferencialmente 7.

35. Para a obtenção da plataforma sensora nanoestruturada, inicialmente, o eletrodo de trabalho com superfície metálica, preferencialmente ouro, é limpo em banho de NaClO , por um período de tempo que varia de 5 a 20min. Em seguida, o eletrodo é lavado com água deionizada e, posteriormente, submetido ao banho ultrassônico durante 5 a 20min, preferencialmente durante 5min.

36. Subsequentemente, o eletrodo de trabalho, devidamente limpo, é imerso em uma solução de MBA, na concentração que é variável de 30 a 70mM, preferencialmente 50mM. O solvente utilizado pode ser etanol, metanol e isopropanol, preferencialmente etanol. O período de incubação varia de 5 a 30min. A utilização do MBA dará origem a uma camada nanoestruturada no ouro do eletrodo devido à presença do grupamento tiol (-SH). Em adição, o MBA fornecerá grupos carboxílicos (-COOH) livres, essenciais para a ancoragem dos demais elementos da plataforma sensora.

37. Posteriormente, o COOH é ativado pelos agentes acopladores EDC NHS (na concentração variável de 0,1 a 0,5M para ambos), favorecendo uma ligação estável do mesmo aos grupamentos amina livres presentes na superfície das nanopartículas magnéticas Fe₃O₄@Quit-synoeca, sendo depositada por um período de tempo que varia de 5 a 20min.

38. Após cada deposição dos componentes da plataforma, o eletrodo de trabalho é cuidadosamente lavado com água deionizada para remoção de compostos não ligados ao eletrodo.

39. Após obtenção da plataforma, demos início aos testes com os microrganismos de interesse clínico, a saber: *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativas), *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* (Gram-positivas), além dos fungos *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. As bactérias e fungos são semeados em meio de cultura ágar Mueller Hinton e Sabouraud, respectivamente, durante 24h, a 37°C, em estufa própria para crescimento microbiano. Após crescimento, as colônias mais isoladas são coletadas e inseridas em solução salina 0,9% esterilizada, e de lá separadas em diferentes concentrações, de acordo com a escala de MacFarland, variando de 10¹ a 10⁵ unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹). Tal procedimento é realizado com o auxílio de espectrofotômetro na região

UV-Vis. Diferentes solventes, bem como amostras biológicas, podem ser utilizados na separação das concentrações de microrganismos, como água, tampão fosfato, solução salina, suor, sangue e urina, preferencialmente tampão fosfato.

40. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), no interior de uma gaiola de Faraday, para maior estabilidade das análises voltamétricas e impedimétricas.

41. Para analisar a detecção dos microrganismos, inicialmente, o eletrodo de trabalho contendo a plataforma biossensora pode ser inserido na suspensão contendo determinado microrganismo, ou $2\mu\text{L}$ da suspensão pode ser diretamente aplicado ao eletrodo. O período de interação biossensor-microrganismo varia de 2 a 10min, preferencialmente 5min.

42. As análises são realizadas em solução de ferro-ferricianeto de potássio, na concentração 1:1, variável de 1 a 50mM, preferencialmente 10mM, preparadas em tampão fosfato de pH 7.

43. Técnicas eletroquímicas como a VC e EIS são extremamente úteis no estudo de biossensores por avaliar as mudanças na dupla camada elétrica que existe entre a solução eletrolítica/sonda redox e a superfície do eletrodo. As medidas de voltametria cíclica são realizadas, preferencialmente, no potencial entre -0,2 a 0,7V, com velocidade de varredura de 50 a $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Para as medidas da espectroscopia de impedância eletroquímica, utiliza-se, preferencialmente, a frequência de 100mHz a 100kHz, com amplitude e onda senoidal de 1-100mV. Um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128N (Ecochemie, Holanda) foi utilizado para a realização das análises.

44. Os resultados voltamétricos e impedimétricos da montagem do sensor indicam a efetiva deposição de cada componente, apresentando o fechamento dos picos catódicos e anódicos (com

exceção da aplicação do EDC NHS + Fe₃O₄@Quit, devido a seu caráter condutor, facilitando a passagem da corrente elétrica) e consequente aumento do semicírculo de Cole-Cole.

45. Em adição, os resultados eletroquímicos, que se referem à identificação dos microrganismos, indicaram efetiva detecção e diferenciação das espécies de Gram-positivas e Gram-negativas, e das espécies de *Candida* sp.

46. O circuito equivalente de Randles avalia os dados experimentais da impedância. Tal circuito é composto pela resistência da solução eletrolítica (R_{Ω}), elemento de fase constante (Q), impedância de Warburg (Z_w) e a resistência à transferência de carga (R_{CT}). Os valores do R_{CT} são os mais utilizados na avaliação de biossensores eletroquímicos, por serem obtidos a partir da variação do semicírculo de Cole-Cole, sendo este diretamente proporcional à concentração do composto adicionado. Por exemplo, os componentes da plataforma biossensora MBA ($R_{CT} = 0,460\text{k}\Omega$) e Fe₃O₄@Quit-synoeca ($R_{CT} = 0,265\text{k}\Omega$), indicados na Tabela 1, e os microrganismos avaliados, demonstrado na Figura 4, apontando diferentes valores de R_{CT} , diretamente proporcionais às concentrações das suspensões microbianas, diferindo entre as espécies devido às características próprias da parede celular de cada microrganismo.

Tabela 1

Plataforma sensora	R_{CT} (k Ω)	Q (μF)	n	R_{Ω}	W
Eletrodo Limpo	0,082	2,080	0,862	0,323	0,987
MBA	0,460	1,810	0,860	0,320	0,986
Fe ₃ O ₄ @Quit-synoeca	0,265	1,850	0,828	0,312	0,974

47. Assim sendo, a Figura 4 exibe os valores do circuito de Randles apresentados por cada microrganismo, onde pode-se observar o

aumento consecutivo dos valores de R_{CT} à medida que a concentração dos analitos-alvo aumenta, sendo estes de 10^1 a 10^5 UFC.mL⁻¹.

48. Os resultados obtidos destacam a capacidade de detecção e diferenciação dos microrganismos conferida pela plataforma biossensora proposta, sendo esta a primeira da literatura a oferecer um sistema sensor baseado no peptídeo antimicrobiano synoeca-MP para detecção de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos em amostras líquidas. Os microrganismos (de elevada eletronegatividade) são inicialmente atraídos eletricamente à estrutura catiônica do synoeca-MP, sendo que este, logo em seguida, se insere à parede celular microbiana. Desta forma, devido às características estruturais de cada microrganismo, uma resposta elétrica específica é obtida.

→ Referências

49. Asia, S. **Who's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths.** *Saudi Medical Journal*, 37(1):108-109, 2016.

50. Bereket, W. *et al.* **Update on bacterial nosocomial infections.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16(8):1039-1044, 2012.

51. Calfee, D. P. *et al.* **Strategies to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infection in acute care hospitals: 2014 update.** *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35(7):772-796, 2014.

52. Dantas, E. M. G. L. *et al.* **Synergistic activity of chlorhexidine and synoeca-MP peptide against *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Cellular Physiology*, 234(9):16068-16079, 2019.

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

54. 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*, 21(8):e788.e1-e788.e13, 2015.

55. Grieshaber, D. *et al.* **Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures.** *Journal of Applied Biomedicine*, Janeiro:57-64, 2008.

56. Hammond, J. L. *et al.* **Electrochemical biosensors and nanobiosensors.** *Essays in Biochemistry*, 60(1):69-80, 2016.

57. Hancock, R. E. W.; Sahl, H. G. **Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies.** *Nature Biotechnology*, 24(12):1551-1557, 2006.

58. 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.

59. Macvane, S. H. **Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on Gram-negative bacterial infections.** *Journal of Intensive Care Medicine*, 32(1):25-37, 2016.

60. Maduraiveeran, G.; Sasidharan, M.; Ganesan, V. **Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications.** *Biosensors and Bioelectronics*, 103(dezembro/2017):113-129, 2018.

61. Mehrad, B. *et al.* **Antimicrobial resistance in hospital-acquired Gram-negative bacterial infections.** *Chest*, 147(5):1413-1421, 2015.

62. Nguyen, L. T.; Haney, E. F.; Vogel, H. J. **The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action.** *Trends in Biotechnology*, 29(9):464-472, 2011.

63. Perez, F. *et al.* **Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system:**

impact of post-acute care facilities on dissemination. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8):1807-1818, 2010.

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

65. Puchter, L. *et al.* **Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci.** *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1)1-7, 2018.

66. Punia, T.; Singh, A. **Biosensors: its types, applications and recent technologies.** *International Journal of Academic Research and Development*, 2(5):837-840, 2017.

67. Saxena, S. K. **Water-associated infectious diseases.** 1^a ed. [s.l.] Springer Nature Singapore, 2020.

68. Singh, A. *et al.* **Application of molecular techniques to the study of hospital infection.** *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3):512-530, 2006.

69. 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*, 407:15-25, 2014.

REIVINDICAÇÕES

1) Biossensor eletroquímico composto por peptídeo, **caracterizado por** ter a análise eletroquímica compreendendo 3 eletrodos, a saber: eletrodo de trabalho, substrato metálico, preferencialmente ouro, em forma de disco ou interdigitado, cuja superfície é funcionalizada por compostos que possuam, em sua estrutura, um grupamento tiol (-SH), preferencialmente ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), nanopartículas metálicas, preferivelmente magnéticas e revestidas pelo polímero natural quitosana e peptídeo antimicrobiano, podendo ser de qualquer tipo ou origem (natural ou sintética); eletrodo de referência, podendo ser de calomelano saturado ou de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) saturado em KCl 3M, preferencialmente Ag/AgCl; eletrodo auxiliar, podendo ser um fio de platina ou carbono e grafite, preferencialmente platina.

2) Biossensor eletroquímico, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** possuir como elemento de biorreconhecimento peptídeo antimicrobiano, preferencialmente o synoeca-MP (INWLKLGKKIIASL-NH₂) podendo ser utilizado de origem natural (isolado a partir da peçonha da vespa social *Synoeca surinama*) ou obtido de forma sintética a partir da sequência de aminoácidos.

3) Peptídeo natural ou modificado de peçonha, **caracterizado por** compreender qualquer uma das seguintes sequências, Xaa1-N-W-Xaa2-K-Xaa3-G-K-K-Xaa4-Xaa5-A-Xaa6-Xaa7-NH₂ (SEQ ID NO: 1), Xaa1-N-W-Xaa2-K-Xaa3-G-K-K-Xaa4-Xaa5-A-Xaa6-Xaa7-OH (SEQ ID NO: 2) e Xaa1-N-W-Xaa2-K-Xaa3-G-K-K-Xaa4-Xaa5-A-Xaa6-Xaa7-R1-R2-R3-NH₂ (SEQ ID NO: 3), onde: Xaa1 é uma isoleucina, leucina ou valina; Xaa2 é uma isoleucina, leucina ou valina; Xaa3 é uma isoleucina, leucina ou valina; Xaa4 é uma isoleucina, leucina ou valina; Xaa5 é uma isoleucina, leucina ou valina; Xaa6 é uma serina ou treonina; R1 é uma lisina ou

arginina; R2 é uma leucina, isoleucina ou valina; R3 é uma leucina, isoleucina ou valina.

4) Peptídeo natural ou modificado de peçonha, de acordo com as Reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelas** sequências compreenderem entre 10 e 17 resíduos de aminoácidos, sendo preferencialmente 14.

5) Peptídeo natural ou modificado de peçonha, de acordo com as Reivindicações 1 e 2, **caracterizado pelas** SEQ ID NO: 1 e SEQ 2/3 ID NO: 1 e 3 poderem compreender uma amidação (NH₂) em sua porção carboxi-terminal.

6) Biossensor eletroquímico, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** ter a avaliação eletroquímica realizada por um potenciostato/galvanostato, tendo como métodos de análise a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

7) Biossensor eletroquímico, de acordo com as Reivindicações 1 e 3, **caracterizado por** ter as medidas eletroquímicas a partir da prévia imersão dos eletrodos em uma solução com função de sonda redox, podendo ser água, tampão fosfato ou solução de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) e ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]), preferencialmente [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ (1:1) preparada em PBS pH 7 e em temperaturas entre 20°C e 30°C, preferencialmente 25°C.

8) Biossensor eletroquímico, conforme Reivindicação 1, **caracterizado por** detectar e diferenciar microrganismos de interesse clínico presentes em amostras líquidas, como água, alimentos líquidos e bebidas, suor, sangue e urina, dentre outros fluidos corporais.

9) Biossensor eletroquímico, conforme Reivindicações 1 e 3, **caracterizado por** ter limite de detecção entre 10¹ a 10⁵ unidades formadoras de colônia por mL de solução (UFC/mL).

10) Processo para síntese de nanopartículas magnéticas, conforme definido na Reivindicação 1, **caracterizado por** compreender: cloreto

férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 0,05 a 0,2M, preferencialmente 0,1M, e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 0,01 a 0,1M, preferencialmente 0,05M, utilizando como método de síntese, preferencialmente, a técnica da co-precipitação; revestimento por polímeros naturais ou sintéticos, preferencialmente quitosana, utilizando como ligante o glutaraldeído 10%; revestimento final com o peptídeo synoeca-MP, se unindo às nanopartículas por meio do glutaraldeído; método de funcionalização compreendendo banho ultrassônico de 1h a 6h em cada etapa, preferencialmente 6h, e agitação magnética vigorosa durante 24h.

11) Processo para montagem do biossensor eletroquímico, conforme definido na Reivindicação 1, **caracterizado por** possuir as seguintes etapas: lavar os eletrodos em água deionizada e o eletrodo de trabalho em NaClO, seguido de banho ultrassônico durante 3 minutos; formação de monocamada automontada de composto contendo grupo tiol e grupamento carboxílico livre, preferencialmente MBA, na superfície do substrato do eletrodo de trabalho, imergindo o eletrodo de 5 a 20 minutos, preferencialmente 10 minutos; utilizar os agentes acopladores 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) na concentração de 0,1 a 1M (1:1), preferencialmente 0,4M e 0,1M, respectivamente, durante 1 a 30 minutos, preferencialmente 5 minutos, para ativação do grupo carboxílico livre do MBA; ligação das nanopartículas Fe_3O_4 @Quit-synoeca ao eletrodo de trabalho contendo o MBA ativado pelo EDC e NHS durante o tempo de 5 a 30 minutos, preferencialmente 10 minutos.

12) Processo, de acordo com a Reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que na análise voltamétrica do processo de montagem do biossensor, após a adição de cada componente, são realizados 1 a 5 ciclos,

preferencialmente 3, de -0,2 a 0,7V, com velocidade de varredura de 10 a 100mV/s, preferencialmente 50mV.

13) Processo, de acordo com a Reivindicação 3, **caracterizado pelo** fato de que a análise impedimétrica é tanto do procedimento de montagem do biossensor como da detecção dos microrganismos.

14) Processo, de acordo com a Reivindicação 8, **caracterizado pelo** fato de que após a ligação de cada componente da plataforma biossensora, o eletrodo de trabalho deve ser lavado em água deionizada ou tampão fosfato pH 7 para remoção de compostos não aderidos.

15) Uso do biossensor eletroquímico, conforme definido nas Reivindicações 1 e 5, **caracterizado por** ser direcionado à detecção de microrganismos como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, protozoários e vírus, preferencialmente bactérias e fungos.

DESENHOS

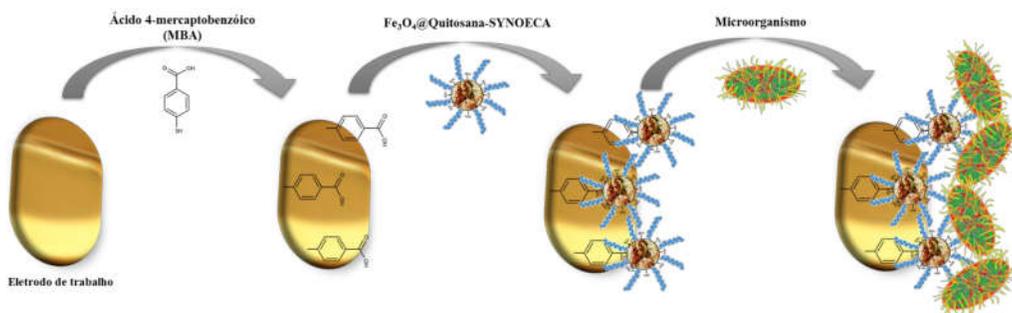


Figura 1

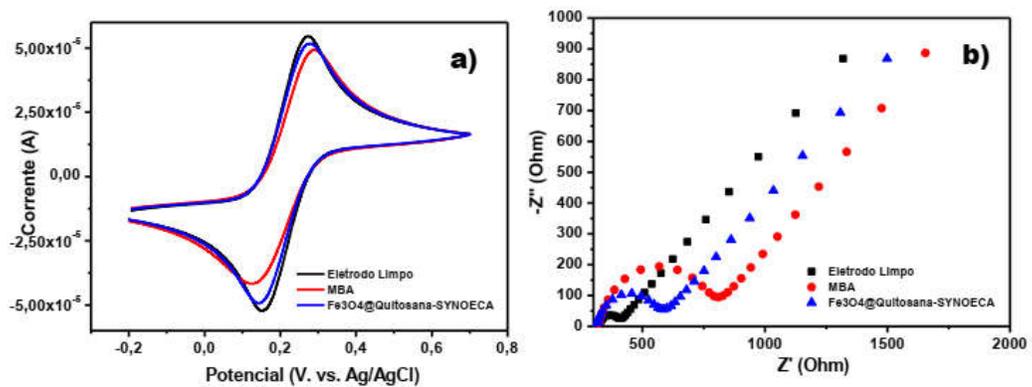


Figura 2

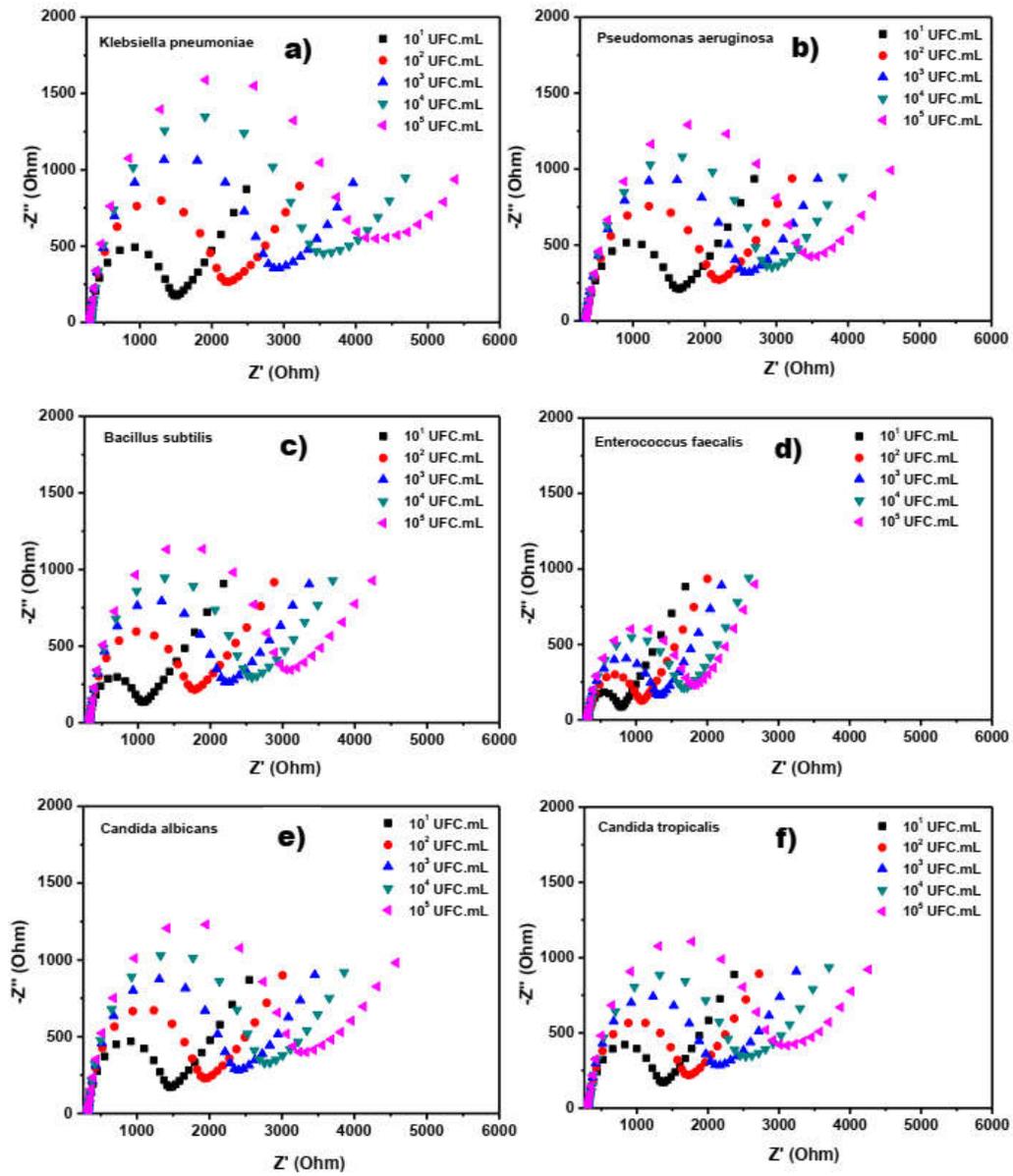


Figura 3

Concentração (UFC.mL ⁻¹)	R _{ct} (kΩ)	Q (μF)	n	R _Ω	W
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
10 ¹	1,17	0,963	0,880	0,306	0,898
10 ²	1,87	0,861	0,891	0,308	0,860
10 ³	2,53	0,827	0,895	0,314	0,807
10 ⁴	3,15	0,818	0,895	0,325	0,746
10 ⁵	3,79	0,817	0,895	0,311	0,705
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
10 ¹	1,28	1,410	0,848	0,343	0,838
10 ²	1,82	1,210	0,861	0,344	0,839
10 ³	2,20	1,060	0,879	0,334	0,844
10 ⁴	2,52	1,020	0,883	0,344	0,831
10 ⁵	3,06	1,030	0,878	0,357	0,769
<i>Candida albicans</i>					
10 ¹	1,14	1,100	0,870	0,318	0,870
10 ²	1,61	0,949	0,884	0,313	0,854
10 ³	2,04	0,875	0,891	0,324	0,834
10 ⁴	2,42	0,839	0,895	0,318	0,811
10 ⁵	2,91	0,793	0,892	0,330	0,717
<i>Candida tropicalis</i>					
10 ¹	1,04	1,480	0,850	0,312	0,893
10 ²	1,40	1,240	0,863	0,310	0,883
10 ³	1,81	1,120	0,867	0,310	0,824
10 ⁴	2,18	1,070	0,864	0,321	0,767
10 ⁵	2,71	0,989	0,876	0,316	0,752
<i>Bacillus subtilis</i>					
10 ¹	0,75	1,490	0,835	0,319	0,845
10 ²	1,43	0,987	0,876	0,328	0,813
10 ³	1,88	0,862	0,889	0,326	0,803
10 ⁴	2,21	0,806	0,895	0,326	0,794
10 ⁵	2,68	0,767	0,900	0,334	0,776
<i>Enterococcus faecalis</i>					
10 ¹	0,412	1,393	0,832	0,335	0,933
10 ²	0,726	1,290	0,855	0,329	0,915
10 ³	0,983	1,170	0,868	0,314	0,941
10 ⁴	1,31	1,080	0,871	0,329	0,884
10 ⁵	1,44	1,030	0,879	0,324	0,920

Figura 4

RESUMO**BIOSENSOR ELETROQUÍMICO COMPOSTO POR PEPTÍDEO, SEU USO E MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS**

A invenção aqui descrita refere-se a um biossensor eletroquímico baseado em novo peptídeo antimicrobiano para a rápida e sensível detecção de microrganismos de interesse clínico. Sua composição nanoestruturada agrega monocamada automontada de ácido 4-mercaptobenzóico (MBA), ligada fortemente ao ouro do eletrodo de trabalho por meio de interações sulfidril-ouro. Nanopartículas magnéticas revestidas por quitosana ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Quit$) foram utilizadas para melhor migração da corrente elétrica e ancoragem ao peptídeo antimicrobiano synoeca-MP, elemento de biorreconhecimento para a identificação e diferenciação de bactérias e fungos presentes em amostras líquidas. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizada para análise do processo de montagem da plataforma biossensora, bem como para determinar a detecção dos analitos-alvo. O sistema apresentado se destaca diante dos métodos tradicionais por dispor de análise rápida (5-10 minutos), limite de detecção de 10^1 a 10^5 UFC.mL⁻¹ e elevado potencial de miniaturização.