



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

(21) BR 102020017284-0 A2



(22) Data do Depósito: 24/08/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 03/03/2022

(54) **Título:** PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARO E USO DO MESMO

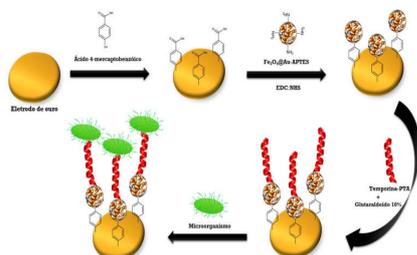
(51) **Int. Cl.:** G01N 33/543; G01N 33/53.

(52) **CPC:** G01N 33/54326; G01N 33/53.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO - UCDB.

(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; LUDOVICO MIGLIOLO; PATRÍCIA SOUZA E SILVA; CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE.

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



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

### → Campo da invenção

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

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

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

→ **Fundamentos da invenção**

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

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

6. Existe uma grande variedade de microrganismos que podem causar infecções no ambiente hospitalar, enfatizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Maior ressalva é dada às bactérias, pois representam cerca de 90% dos casos de IH no mundo (Bereket *et al.*, 2012; Khan, Ahmad, Mehboob, 2015). Dentre as Gram-positivas, podemos destacar o *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*. Em relação às Gram-

negativas, cuja presença remete e maior gravidade do caso de IH, sobressai-se a *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Agarwal, Shiau, Larson, 2018).

7. Alguns dos métodos de diagnóstico presuntivo mais utilizados são os tradicionais meios de cultura sólidos, semissólidos e caldos nutritivos seletivos e específicos, reações antígeno-anticorpo desencadeadas por testes como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e testes moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas variáveis (Mohammadkazemi, Azin, Ashori, 2015; Verma, Saxena, Babu, 2013).

8. Como alternativa aos métodos tradicionais, biossensores eletroquímicos se destacam como uma inovadora ferramenta de análise de analitos de interesse clínico. O primeiro biossensor proposto por Clark e Lyons datado na década de 50 abriu novas portas na área diagnóstica, cuja utilidade se expandiu para diversas áreas, sobretudo a da saúde (Saleem, 2013). A estrutura básica de um biossensor compreende um elemento de capacidade sensora biológica ativa que apresenta especificidade ao analito-alvo (ex: peptídeos, enzimas, fragmentos de DNA, RNA, etc.), um transdutor com o papel de “traduzir” a interação elemento sensor → analito em um sinal detectável (ex: eletroquímico, óptico, acústico, etc.), um processador de sinal e um software para análise de dados (Perumal, Hashim, 2014).

9. Transdutores eletroquímicos se destacam entre as demais opções devido ao baixo custo de equipamentos associado a sensibilidade na avaliação de reações químicas ocorrendo na interface existente entre um condutor de elétrons e um eletrólito (Faridbod, Norouzi, Ganjali, 2015). Em adição, técnicas voltamétricas na figura da VC e

impedimétricas como a EIS configuram-se como ferramenta inovadora na área médica-diagnóstica, conferindo fácil entendimento de análise de resultados de biossensores. Basicamente, avaliam as mudanças físico-químicas que ocorrem na interface de uma solução eletrolítica que funciona como um par redox e um eletrodo de trabalho cuja superfície foi modificada por uma plataforma sensora nanoestruturada especificamente para determinado analito. Os valores de resistência a transferência de carga ( $R_{CT}$ ), cuja variação denota a interação dos componentes da plataforma sensora com o substrato, mas principalmente o evento da ligação do elemento sensor com o analito alvo (ex: fragmento de DNA e sequência complementar, inserção de um peptídeo na parede celular microbiana, etc.), sendo esta interação proporcional a concentração do alvo terapêutico (Lisdar, Schäfer, 2008).

10. Peptídeos com atividade antibiótica tornaram-se uma alternativa moderna frente ao persistente problema da resistência a antimicrobianos, uma vez que apresentam seletividade singular a microrganismos, sendo inativas diante de células sanguíneas (Peters, Shirliff, Jabra-Rizk, 2010). Tal atividade singular abre portas para diferentes aplicações, como na área de biossensores, uma vez que a estrutura de um PAM favorece uma forte interação com membrana microbiológicas, sendo, portanto, utilizadas como biomaterial de reconhecimento. Ademais, as peculiaridades da estrutura microbiana permitem que os peptídeos explorados pela técnica eletroquímica sejam capazes de diferenciar entre bactérias Gram-positivas e Gram-positivas (Silva Júnior *et al.*, 2018).

11. Muito empenho tem se criado para a identificação de microrganismos, resultando em inúmeros estudos. Por exemplo, a

patente WO 2018102350 determinou o desenvolvimento de um sensor microbiano baseado de nanopartículas magnéticas oxidadas ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) modificadas por bacteriófagos, tendo como alvo as bactérias *E. coli* e *Listeria monocytogenes*.

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

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

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

15. A invenção aqui proposta se diferencia das anteriormente citadas pelo fato de ser a única que utiliza monocamadas automontadas

de ácido 4-mercaptopbenzóico (MBA), nanopartículas magnéticas revestidas por ouro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ) e o peptídeo temporina-PTA para detecção e diferenciação de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos por meio da VC e EIS.

→ **Breve descrição dos desenhos**

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

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

18. A Figura 3 apresenta graficamente os resultados de detecção dos microrganismos referentes à análise por voltametria cíclica.

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

→ **Descrição da invenção**

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

21. As  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram sintetizadas através do método de coprecipitação. Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em concentrações predeterminadas foram depositados em um béquer e recobertos com água deionizada ultrapura (50-150 mL). A solução foi mantida em agitação magnética entre 50-70 °C durante 1-5 horas. Em

seguida, 5-25 mL de hidróxido de amônia ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) é adicionado, resultando na mudança de cor da solução de marrom para preta, indicando a obtenção das nanopartículas magnéticas. A solução é mantida em agitação por mais 1-5 horas. Por fim, o precipitado é recolhido com o auxílio de um imã, sendo lavado 6 vezes em água deionizada e etanol e seco em estufa.

22. A obtenção da nanopartícula modificada pelo ouro e APTES se deu utilizando 100 mg do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e unindo ao ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) em 10-100 mM. A solução foi disposta em banho ultrassônico durante 10-60 min, seguido de agitação magnética (10-60 min). O  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  é finalmente obtido através da redução do  $\text{Au}^{3+}$  pela glicose (10-100 mM), no qual a solução se manteve em agitação magnética por 1 hora. As nanopartículas são por fim recolhidas por um imã e lavadas em água deionizada.

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

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

25. A construção do biossensor proposto segue o seguinte processo: um eletrodo de trabalho com superfície metálica, preferencialmente ouro, é utilizada na montagem da plataforma biossensora. Inicialmente, o eletrodo é lixado em feltro e alumina, seguido de limpeza em água deionizada e  $\text{NaClO}$ , finalizando com banho ultrassônico. Após limpeza do eletrodo, o padrão voltamétrico e

impedimétrico do eletrodo limpo é avaliado, mergulhando o mesmo em uma solução de 10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  preparado em tampão fosfato (pH 7). Esta mesma solução será utilizada na avaliação de montagem do biossensor, bem como na análise da detecção dos analitos-alvo.

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

27. Em seguida, os agentes acopladores N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (0,4 M EDC - 0,1 M NHS, 1:1, v/v) são adicionados ao MBA presente na superfície do eletrodo, visando a ativação dos grupos carboxílicos livres do MBA a ser ligado ao próximo componente do biossensor, as nanopartículas magnéticas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{-APTES}$ , rica em grupamentos amina livres provenientes do APTES.

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

29. Diferentes tipos e espécies de microorganismos foram estudados para avaliar a sensibilidade do sistema sensor proposto  $\text{MBA\_Fe}_3\text{O}_4@Au\text{-APTES\_T-PTA}$ . Bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*), Gram-negativas (*Acinetobacter baumannii*) e duas espécies de fungos do gênero *Candida* (*Candida albicans* e *Candida krusei*). As bactérias foram semeadas em ágar Mueller Hinton, enquanto

que os fungos foram semeados em ágar Sabouraud. Os microrganismos foram incubados durante 24 h a 37° C.

30. Cada inóculo isolado é recolhido e disposto em solução salina esterilizada e posteriormente mergulhado em tampão fosfato pH 7, seguido a separação em diferentes concentrações na forma de UFC.mL<sup>-1</sup>, de acordo com a escala de McFarland (10<sup>1</sup> a 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>). UV-vis é utilizado para obtenção das concentrações descritas, na densidade óptica de 60 nm e ajuste para 0,50.

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

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

33. VC e EIS foram conduzidos em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: um eletrodo de trabalho com superfície de ouro (ET); um eletrodo de referência saturado com KCl 3M (ER) e um eletrodo auxiliar de platina (EA). Os eletrodos são imersos na solução de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> / [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> 10mM em tampão fosfato (pH 7).

34. VC tem como parâmetros principais potencial de -0,2 a 0,7 com uma taxa de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup> e EIS foi conduzido na frequência de 100 mHz a 100 kHz com amplitude e onda senoidal de 1-25 mV. Todas análises foram realizadas no interior de uma gaiola de Faraday.

**→ Exemplos de concretizações da invenção**

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

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

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

38. Polímeros naturais e sintéticos podem ser utilizados na ancoragem de elementos sensores que tem o papel de biorreconhecimento frente o analito-alvo. Entretanto, se tratando de uma plataforma nanoestruturada eletroquímica, nanopartículas metálicas, sobretudo as magnéticas e com a presença de ouro é preferível. Nanopartículas metálicas dispõem da vantagem de favorecerem a migração da corrente de elétrons da solução eletrolítica redox (geralmente ferro/ferricianeto de potássio) para a superfície do eletrodo onde está montada a plataforma sensora. Dessa forma, as nanopartículas magnéticas revestidas por ouro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ) utilizadas

promoveram um aumento na sensibilidade do biodispositivo desenvolvido, elevando, por sua vez, a resposta eletroquímica avaliada pela VC e EIS, culminando na melhor diferenciação entre as espécies e tipo de microorganismos.

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

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

41. Quando comparado com métodos tradicionais como os meios de cultura sólidos, semissólidos e caldos nutritivos, o biossensor desenvolvido tem a vantagem de detectar outros tipos de microrganismos (como protozoários), além de ter um limite de detecção de  $10^1$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de solução. Em adição, por apresentar componentes nanoestruturados, a plataforma biossensora tem a vantagem de ser integrada a dispositivos portáteis

miniaturizados, favorecendo seu uso para finalidades clínicas e de pesquisa.

42. A tabela abaixo apresenta os valores dos componentes do circuito equivalente de Randles, obtidos a partir dos espectros de impedância dos diagramas de Nyquist obtidos através da análise por EIS. Podemos destacar os valores do  $R_{CT}$ , a resistência à transferência de carga apresentada após interação com determinado microorganismo em diferentes concentrações ( $10^1$  a  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Pode-se observar que os valores de  $R_{CT}$  foram crescentes à medida que a concentração do microrganismo na suspensão aumenta. Também é perceptível que maiores valores de  $R_{CT}$  foram obtidos pelas bactérias Gram-negativas, justamente devido à carga de superfície ser mais eletronegativa quando comparado com as Gram-positivas, que possui uma camada espessa de peptidoglicano que confere a elas uma relativa presença de cargas positivas. Dessa forma, há maior interação entre a eletronegatividade das Gram-negativas e a elevada cationicidade do peptídeo Temporina-PTA, seguindo a permeabilização da parede celular. Portanto, destaca-se a capacidade do biossensor desenvolvido de diferenciar as bactérias entre classes.

Concentração (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$R_{ct}$ (k $\Omega$ )	Q ( $\mu$ F)	n	$R_{\Omega}$	W
<i>Bacillus subtilis</i>					
$10^1$	0,78	1,35	0,885	0,297	1,51
$10^2$	1,22	1,24	0,896	0,308	1,49
$10^3$	1,60	1,19	0,900	0,303	1,43
$10^4$	1,76	1,19	0,898	0,306	1,39
$10^5$	2,68	0,767	0,9	0,334	0,77

<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>					
10 <sup>1</sup>	0,67	1,57	0,882	0,288	1,49
10 <sup>2</sup>	0,86	1,42	0,892	0,284	1,51
10 <sup>3</sup>	1,09	1,36	0,893	0,288	1,45
10 <sup>4</sup>	1,27	1,31	0,896	0,284	1,48
10 <sup>5</sup>	1,47	1,25	0,901	0,291	1,45
<b><i>Acinetobacter baumannii</i></b>					
10 <sup>1</sup>	1,16	1,33	0,874	0,280	1,41
10 <sup>2</sup>	1,50	1,19	0,891	0,266	1,46
10 <sup>3</sup>	1,90	1,10	0,898	0,268	1,40
10 <sup>4</sup>	2,20	1,06	0,901	0,277	1,36
10 <sup>5</sup>	2,57	1,03	0,903	0,271	1,31
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>					
10 <sup>1</sup>	1,32	0,836	0,908	0,274	1,41
10 <sup>2</sup>	2,10	0,762	0,918	0,278	1,29
10 <sup>3</sup>	2,70	0,740	0,917	0,303	1,18
10 <sup>4</sup>	3,07	0,722	0,922	0,274	1,11
10 <sup>5</sup>	3,57	0,710	0,924	0,286	1,03
<b><i>Candida albicans</i></b>					
10 <sup>1</sup>	0,77	1,59	0,871	0,309	1,43
10 <sup>2</sup>	1,25	1,36	0,886	0,302	1,36
10 <sup>3</sup>	1,57	1,26	0,892	0,305	1,35
10 <sup>4</sup>	1,87	1,22	0,894	0,317	1,28
10 <sup>5</sup>	2,17	1,21	0,895	0,299	1,26
<b><i>Candida tropicalis</i></b>					
10 <sup>1</sup>	0,72	1,35	0,886	0,286	1,53
10 <sup>2</sup>	0,99	1,24	0,893	0,279	1,49

10 <sup>3</sup>	1,21	1,17	0,898	0,278	1,44
10 <sup>4</sup>	1,42	1,13	0,900	0,288	1,39
10 <sup>5</sup>	1,66	1,07	0,905	0,283	1,35

43. O biossensor aqui proposto foi capaz de detectar e diferenciar entre 6 diferentes microrganismos, a saber, bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*), bactérias Gram-negativas (*Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*) e fungos, como leveduras do gênero *Candida* spp. (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*), cujo limite de detecção de 10<sup>1</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> se destaca quando comparado com métodos tradicionais ou outros biossensores voltados à detecção microbiana, uma vez que a análise eletroquímica é de fácil compreensão, além de fácil e rápida montagem da plataforma biossensora (em média 50 minutos + 10 minutos de análise da amostra com suspeita de contaminação com microorganismos). Em adição, é importante ressaltar que o biossensor desenvolvido pode ser direcionado a outras espécies de bactérias e fungos, além de outros microrganismos, como protozoários.

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

## REIVINDICAÇÕES

1) Plataforma biossensora de microrganismos, **caracterizado por** possuir três eletrodos independentes, em que:

- o eletrodo de trabalho possui uma superfície metálica, preferencialmente ouro, modificado por uma monocamada automontada de um composto tiolado, de preferência o ácido 4-mercaptopbenzóico, nanopartículas magnéticas revestidas por ouro e peptídeo antimicrobiano, podendo ser de qualquer tipo ou origem (natural ou sintética), sendo preferivelmente o peptídeo temporina-PTA (FFGSVLKILPKIL-NH<sub>2</sub>);

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

- o eletrodo auxiliar é um fio de platina.

2) Plataforma biossensora, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** terem os eletrodos conectados a um potenciostato e circuito para medida da espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica, no interior de uma gaiola de Faraday.

3) Plataforma biossensora, conforme Reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** apresentar limite de detecção entre 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

4) Processo para obtenção de nanopartículas magnéticas revestidas por ouro e 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado pela** síntese de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pelo método de co-precipitação utilizando preferivelmente cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) e sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), seguido da modificação das nanopartículas pelo ácido tetracloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) e redução pela

glicose, e por fim, modificação superficial por APTES, dando origem às nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES}$ .

**5)** Processo para preparo da plataforma biossensora, conforme definido na Reivindicação 1, **caracterizado por** apresentar as etapas de: a) lavar o eletrodo de trabalho em feltro e alumina, seguido de banho em água deionizada e  $\text{NaClO}$ , finalizando com banho ultrassônico; b) funcionalizar a superfície metálica do eletrodo de trabalho com o composto tiolado, obtendo uma monocamada automontada para ancorar os demais componentes da plataforma biossensora; c) ligação das nanopartículas magnéticas, preferencialmente  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES}$ , auxiliando na migração da corrente de elétrons e na ancoragem do peptídeo; d) adsorção de peptídeo antimicrobiano.

**6)** Processo para preparo da plataforma biossensora, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que, na etapa (b), o eletrodo de trabalho é mergulhado de 5 a 60 min, preferencialmente 10 min, em uma solução contendo de 10 a 50 mM, preferencialmente 30 mM, de ácido 3-mercaptopbenzóico.

**7)** Processo para preparo da plataforma biossensora, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que, na etapa (c), as nanopartículas de material metálico, preferencialmente  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-APTES}$ , são inicialmente funcionalizadas pelos agentes acopladores N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (0,4 M EDC - 0,1 M NHS, 1:1, v/v) e seguidamente adsorvidas no eletrodo de trabalho durante 5 a 60 min, preferencialmente 10 min.

**8)** Processo para preparo da plataforma biossensora, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado pelo** fato de que, na etapa (d), o elemento de biorreconhecimento de microrganismos seja um peptídeo antimicrobiano, preferencialmente, o peptídeo temporina-PTA;

glutaraldeído 10% é utilizado antes da ligação do peptídeo, ligando-o às nanopartículas magnéticas; o tempo de adsorção é de 5 a 60 min, preferencialmente 10 minutos.

9) Processo para preparo da plataforma biossensora, de acordo com a Reivindicação 5, **caracterizado por**, após cada etapa de montagem da plataforma biossensora, o eletrodo de trabalho é lavado em água deionizada para remoção de agentes não ligados.

10) Uso da plataforma biossensora, conforme definido nas Reivindicações 1 e 3, **caracterizado pelo** fato de ser direcionado para detecção de microrganismos, dentre eles bactérias, fungos e protozoários.

FIGURAS

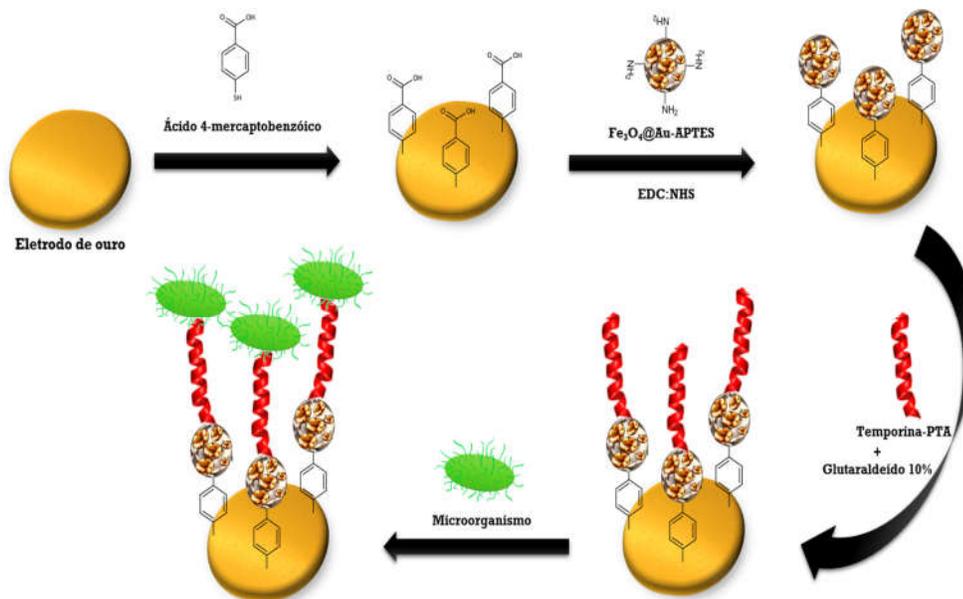


Figura 1

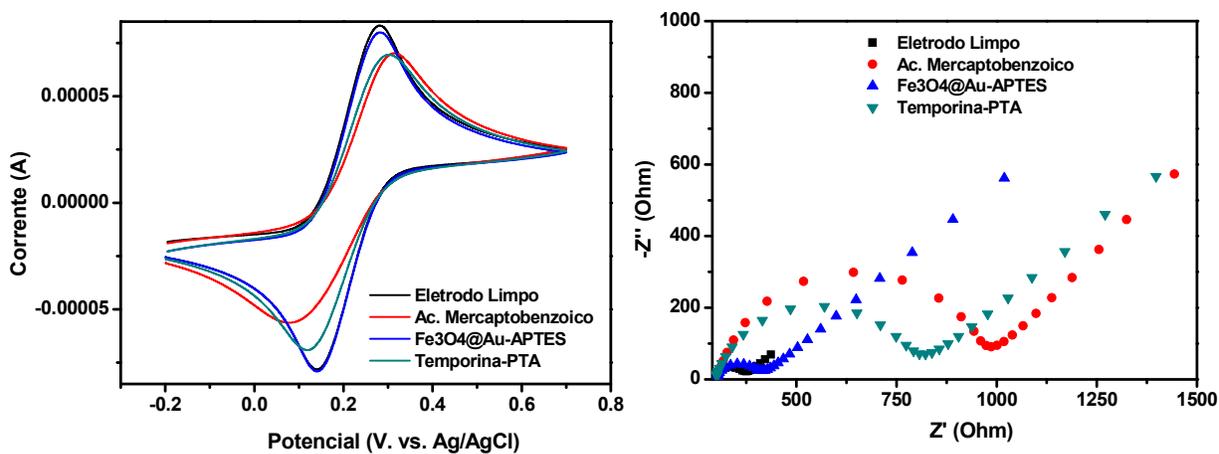


Figura 2

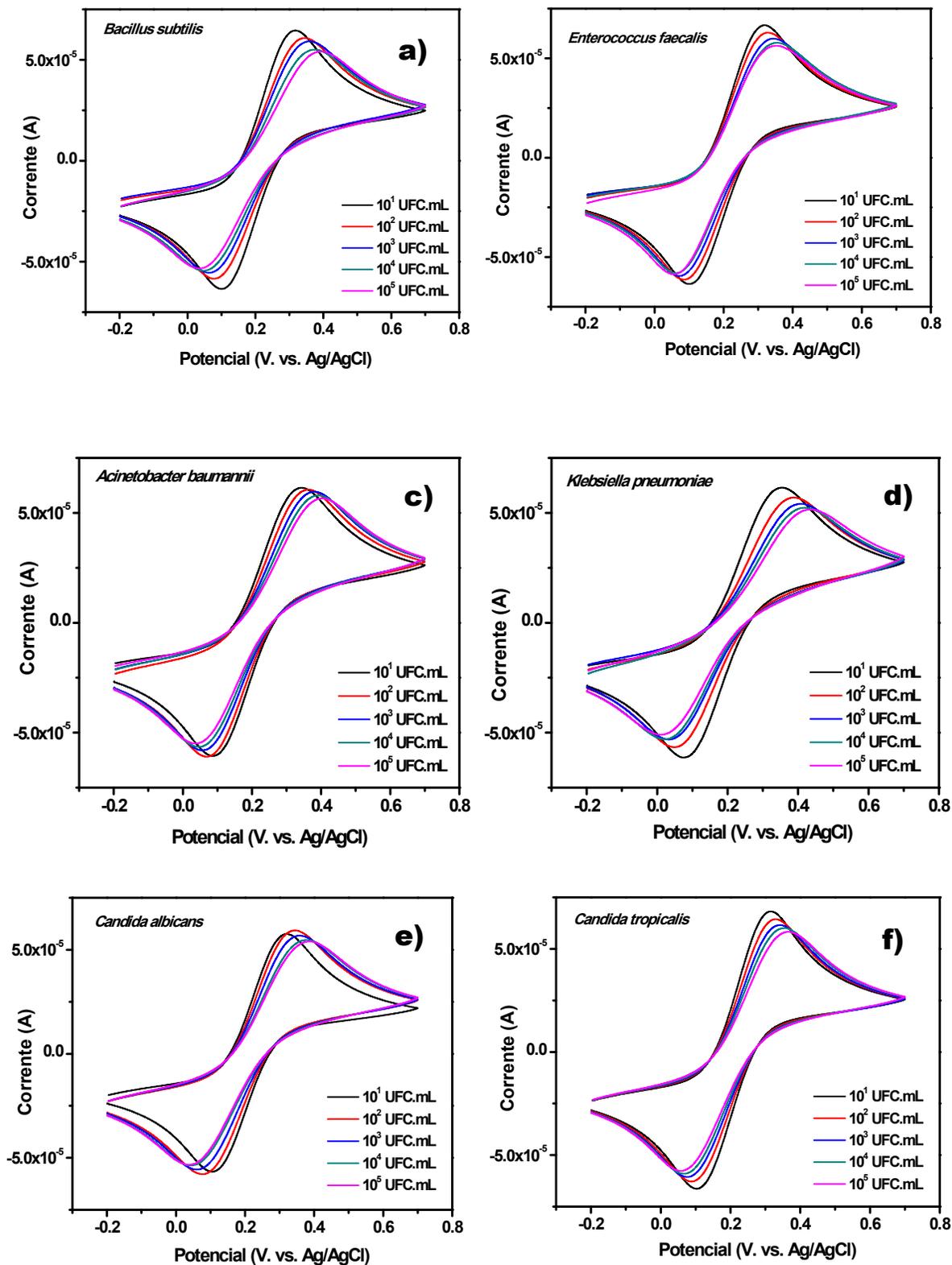


Figura 3

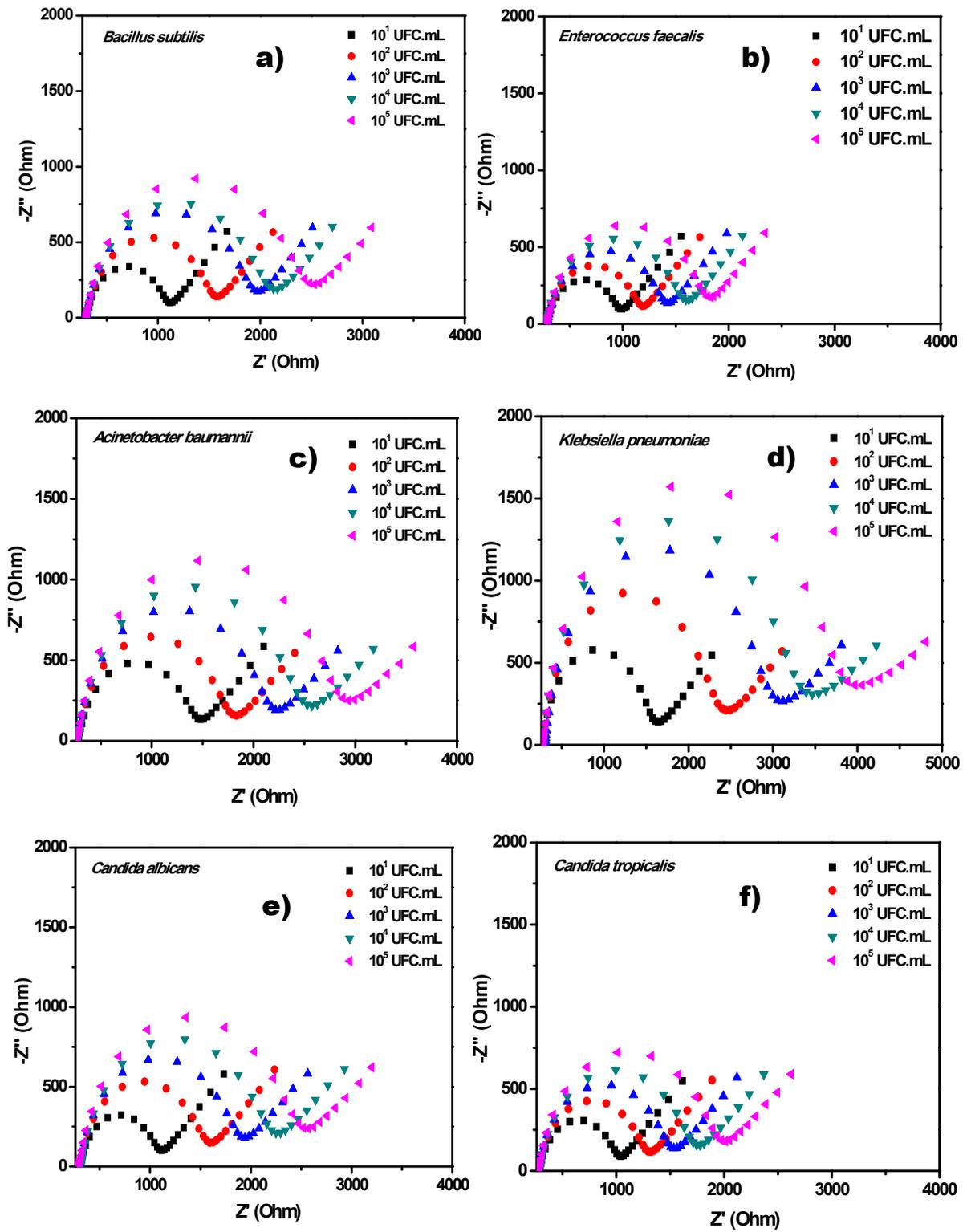


Figura 4

**RESUMO****PLATAFORMA BIOCENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM PEPTÍDEO  
ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARO E USO DO MESMO**

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