



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

KALLINE LOURENÇO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURAS PARA APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS EM DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E ENGENHARIA
DE TECIDOS**

Recife

2020

KALLINE LOURENÇO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURAS PARA APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS EM DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E ENGENHARIA DE
TECIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de Concentração: Fármacos, medicamento e insumos essenciais para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ribeiro, Kalline Lourenço

Desenvolvimento de nanoestruturas para aplicações biotecnológicas em diagnóstico microbiológico e engenharia de tecidos / Kalline Loureço Ribeiro. - 2020.

182 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Biotecnologia. 2. Nanotecnologia. 3. Células-Tronco. I. Andrade, César Augusto Souza de (orientador). II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorientadora) III. Título.

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-252

KALLINE LOURENÇO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOESTRUTURAS PARA APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS EM DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E ENGENHARIA
DE TECIDOS.**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção
do título de Doutor em Inovação
Terapêutica.

Aprovada em: 09 de Setembro de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Universidade Federal de Pernambuco/
Dep. de Bioquímica).

Prof. Dr. Isaac Aarón Morales Frías (Universidade Federal de Pernambuco/ Lab. de
Biodispositivos Nanoestruturados).

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Universidade Federal de
Pernambuco/ Dep. de Bioquímica).

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco (Universidade Católica de Brasília/ Pós-Graduação em
Ciências Genômicas e Biotecnologia).

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Universidade Federal de Pernambuco/
Departamento de Medicina Tropical).

Aos meus pais, Manoel e Francisca,
por todo apoio, amor e paciência...

...dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, pelo dom da vida, pelo seu imenso amor de Pai e por todas as bênçãos e livramentos até aqui concedidos. Agradeço por me dar forças para conclusão deste trabalho.

À Virgem Maria, Mãe Santíssima, por passar sempre a frente em todos os momentos que pensei em desistir, me cobrindo com seu manto de amor.

Aos meus pais, Manoel e Francisca, que doaram suas vidas à criação dos filhos. Eles são minha base e minha fortaleza. Agradeço por todo suporte que me proporcionaram no decorrer da minha caminhada acadêmica e, principalmente, por todo amor e compreensão.

Aos meus familiares, por fazerem parte da minha história. Meus irmãos (Karla e Carlos), meus tios, primos e especialmente, à minha avó paterna Luiza “Tia” (*in memorian*), pelo apoio na minha criação e nos meus estudos.

Ao meu orientador, professor Dr. César Augusto, agradeço por todos os ensinamentos, paciência, por estar sempre disponível para sanar dúvidas e direcionar da melhor forma o caminho para a realização deste objetivo e, principalmente pelo apoio e compreensão quando precisei.

À minha coorientadora, professora Dra. Maria Danielly, pelas importantes contribuições no decorrer desse período. Por se manter sempre presente e prestativa, transmitindo conhecimentos e tranquilidade em vários momentos decisivos dessa caminhada.

Aos companheiros de laboratório, pela ótima convivência, sempre pacífica e engrandecedora.

Às minhas amigas, Flávia e Karen, pelas alegrias, tristezas, conquistas e acontecimentos compartilhados. E em especial a Giselle, por toda força, palavras de apoio e por ser uma amiga tão presente. Agradeço por toda amizade e por saber que posso contar sempre com vocês.

Aos amigos Isaac e Alberto por toda a ajuda que me proporcionaram. Desde o auxílio nos experimentos, no trabalho em si, até os bons momentos partilhados, conversas, risadas e desabafos.

Às companheiras de apartamento, Helena, Gisléa, Jeoadã e Sarah. Agradeço pela convivência tranquila e amiga que tornaram mais leves os dias distantes da família.

Aos colaboradores, Professora Marcia Bezerra e Professor Cláudio Gabriel (Departamento de Biofísica da UFPE), Wyndly Daniel (Mestrando no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Professor Octávio Franco (Universidade Católica de Brasília), Professor Reginaldo Gonçalves (Departamento de Parasitologia-UFPE), Sandra (Egressa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-UFPE) pela rica contribuição que proporcionaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, em especial Paulo Germano (Secretário do PPGIT), por ser extremamente prestativo e competente, auxiliando em todos os momentos.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

Gratidão a todos!!!

***“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu...”***

(Eclesiastes 3:1-8)

RESUMO

Dentre as principais aplicações da bionanotecnologia, podemos citar a criação de sistemas de liberação controlada de fármacos, sistemas de detecção de biomarcadores, nanossensores, biochips e o uso na restauração de tecidos e órgãos em engenharia de tecidos. Neste sentido, o presente trabalho traz o desenvolvimento de nanoestruturas para uso como biossensores e aplicação na engenharia de tecidos. O primeiro sistema refere-se a nanofibras compostas por polímeros de PVA/lectinas e PVA/quitosana/lectinas produzidos pela técnica de eletrospinning. Foram utilizadas as lectinas Concanavalina A e Aglutinina de germém de trigo (WGA), proteínas de origem não-imune que se ligam a carboidratos de superfície celular e promovem adesão e diferenciação celular. As fibras poliméricas foram investigadas quanto a capacidade de aderência e comportamento proliferativo de células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de cordão umbilical humano. Sua aplicabilidade foi avaliada através da resposta dielétrica pela técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) antes e após serem submetidas a cultura celular, em diferentes períodos de tempo. Além disso, foi explorada as propriedades morfológicas das fibras por microscopia de força atômica (AFM) e realizado o teste de citotoxicidade por MTT. Como resultados, as nanofibras promoveram a adesão e proliferação das CTMs adicionadas, assim como, não houve morte celular significativa. O segundo sistema refere-se ao desenvolvimento de um biodispositivo que pretende auxiliar no diagnóstico de Candidemias. Foi desenvolvida uma plataforma biossensora nanoestruturada baseada em uma monocamada automontada de poli (ácido tiofeno acético) (PTAA), nanopartículas de TiO₂ aminadas e o peptídeo Clavanina-MO que detecta e diferencia *Candida spp* patogênica. Alguns peptídeos antimicrobianos (PAMs) demonstram eficiência no reconhecimento de grupos negativos da membrana celular de microrganismos, sendo assim explorados para o desenvolvimento de biossensores. A Clavanina-MO é um PAM sintético obtido a partir da inserção dos resíduos de aminoácidos FLPII na extremidade N-terminal da Clavanina A, peptídeo natural obtido do tunicado *Styela clava*. Como resultados, o filme de PTAA foi formado na superfície do eletrodo através da técnica de Voltametria cíclica, aumentando a condutividade do sistema. As nanopartículas de dióxido de titânio aminadas aumentaram a área superficial e melhoraram a transferência de elétrons. A análise topográfica do

biossensor, feita por AFM, revelou modificações significativas na altura e rugosidade na superfície do sensor, indicando o reconhecimento seletivo. A técnica de EIE evidenciou uma crescente resistência à transferência de carga em cada concentração. O biossensor foi capaz de reconhecer e diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, apresentando um limite de detecção de 101 CFC/mL. Portanto, o presente estudo representa potencial contribuição tanto para o campo dos biossensores como da engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Células-tronco; Eletrofição; Biossensor; Candida; Nanotecnologia.

ABSTRACT

Among the main applications of bionanotechnology, we can mention the creation of controlled drug release systems, detection systems for biomarkers, nanosensors, biochips, and the use in tissue engineering for the restoration of tissues and organs. In this sense, the present work we developed nanostructures for use as biosensors and applications in tissue engineering. The first system refers to nanofibers composed of polymers of PVA/lectins and PVA/chitosan/lectins produced by the electrospinning technique. Concanavalin A and Wheat Germ Agglutinin (WGA) lectins were used. Lectins are prns of non-immune origin that bind to cell surface carbohydrates and are capable of promoting cell adhesion and differentiation. The polymeric fibers were investigated for the adhesion capacity and proliferative behavior of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the human umbilical cord. The applicability was evaluated through the dielectric response by using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIE) technique before and after cell culture, in different periods. Besides, the morphological properties of the fibers were evaluated by atomic force microscopy (AFM) and MTT cytotoxicity test. As a result, the nanofibers proved to be able to facilitate the adhesion and proliferation of the added MSCs. The nanofibers did not promote significant cell death. The second system refers to the development of a bio-device to the diagnosis of Candidemias. A nanostructured biosensor platform was developed based on a self-assembled poly (thiophene acetic acid) monolayer, TiO₂ nanoparticles and Clavanin-MO peptide for the detection and differentiation of pathogenic *Candida* spp. Some antimicrobial peptides (AMPs) demonstrate efficiency in the recognition of negative groups of the microorganism's cell membrane and can be explored for the development of biosensors. Clavanine-MO is a synthetic AMP obtained from the insertion of FLPII amino acid residues at the N-terminal end of Clavanine A (a natural peptide derived from the marine tunicate *Styela clava*). As a result, the PTAA film was obtained on the electrode surface using the cyclic voltammetry technique, increasing the conductivity of the system. The amine titanium dioxide nanoparticles increased the surface area and improved the transfer of electrons. The topographic analysis of the biosensor, performed by AFM, revealed significant changes in height and roughness on the sensor surface, indicating selective recognition. The EIE technique showed increased resistance to charge transfer in each concentration. The biosensor was able to recognize and differentiate *C. albicans*, *C.*

tropicalis, *C. glabrata* and *C. krusei*, with a detection limit of 10¹CFC/mL. Therefore, the present study represents a potential contribution to both the field of biosensors and tissue engineering.

Keywords: Stem cells; Electrospinning; Biosensor; Candida; Nanotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Ilustração da Matriz Extracelular (MEC).....	25
Figura 2– Estrutura Química da Quitosana.....	28
Figura 3– Estrutura química do Álcool Polivinílico (PVA).....	30
Figura 4– Classificação das lectinas de acordo a estrutura.....	31
Figura 5– a) Imagem das sementes de <i>Canavalia ensiformes</i> e b) Estrutura tridimensional do tetrâmero da Concanavalina A.....	33
Figura 6– a) Imagem de panículas de gérmen de trigo e b) Estrutura tridimensional da lectina WGA.....	35
Figura 7– Mecanismos de ação dos PAMs sobre a membrana bacteriana.....	40
Figura 8– <i>Styela clava</i> , tunicado do qual foi isolado o PAM Clavanina.....	41
Figura 9– Esquemática do corte transversal de cordão umbilical humano.....	47
Figura 10– Esquema da aparelhagem da técnica de eletrofiação.....	50
Figura 11– Exemplos de Nanomateriais.....	59
Figura 12– Representações cristalográficas do dióxido de titânio (TiO ₂).....	62
Figura 13– Esquema dos componentes de um biossensor.....	63
Figura 14– Ilustração esquemática dos métodos de imobilização comumente usados para biomoléculas nas superfícies dos eletrodos.....	66
Figura 15– Ilustração de como a impedância pode ser representada. a) quociente das funções tensão (V) e corrente (I) e b) módulo de Z e o ângulo de fase ϕ , ou partes reais (Z _R) e imaginárias (Z _I) da impedância.....	72
Figura 16– a) gráfico de bode, b) gráfico de nyquist e c) circuito de Randles.....	73
Figura 17– Ilustração de uma configuração típica de uma análise voltamétrica.....	75
Figura 18– Voltamograma cíclico.....	76
Figura 19– a) Imagem de um microscópio eletrônico de varredura e b) Ilustração esquemática dos componentes gerais de um AFM.....	77
Figura 20– Representação esquemática dos modos de operação em AFM.....	78
Figura 21– Redução enzimática de MTT para Formazan.....	80
Figura 22– Imagem da célula-eletróquímica utilizada para análise de EIE.....	84
Figura 23– Diagrama esquemático para a construção do biossensor modificado com PTAA / TiO ₂ NPs / CLAVMO.....	87

Figura 24– Micrografias de AFM de nanofibras secas. PVA puro (a), PVA_WGA (b), PVA_ConA (c), PVA_QS(d), PVA_QS_WGA (e), PVA_QS_ConA (f).....	88
Figura 25– Micrografias de AFM das nanofibras após a incubação. a) PVA_WGA 12 horas de incubação, b) PVA_ConA 12 horas de incubação, c) PVA_Chitosan 12 horas de incubação, d) PVA_QS_WGA 12 horas de incubação, e) PVA_QS_ConA 12 horas de incubação, f) PVA_WGA 24 horas de incubação, g) PVA_ConA 24 horas de incubação, h) PVA_QS 24 horas de incubação, i) PVA_QS_WGA 24 horas de incubação, j) PVA_QS_ConA 24 horas de incubação.....	89
Figura 26–Ensaio de viabilidade celular após 24 e 48 horas de incubação.....	90
Figura 27– Diagramas de Nyquist das nanofibras expostas às células-tronco. PVA_ConA (a), PVA_WGA (b), PVA_Quitosana (c) PVA_QS_ConA (d), PVA_QS_WGA (e) em momentos diferentes.....	91
Figura 28– Diagramas de Bode das nanofibras expostas às células-tronco. PVA_ConA (a), PVA_WGA (b), PVA_Quitosana (c) PVA_QS_ConA (d), PVA_QS_WGA (e) em momentos diferentes.....	93
Figura 29–Circuito equivalente usado para ajustar os resultados experimentais, onde R_s representa a resistência ôhmica da solução eletrolítica, Q é o elemento constante de fase, W é a impedância de Warburg e R_{ct} é a resistência de transferência de carga.....	95
Figura 30–Imagens 3D AFM do eletrodo de trabalho de ouro revestido com filmes PTAA (a), PTAA_TiO ₂ NPs (b), PTAA_TiO ₂ NPs_CLAVMO (c), PTAA_TiO ₂ NPs_CLAVMO_ <i>C. Krusei</i> (d), PTAA_TiO ₂ NPs_CLAVMO_ <i>C. glabrata</i> (e), PTAA_TiO ₂ NPs_CLAVMO_ <i>C. tropicalis</i> (f) e PTAA_TiO ₂ NPs_CLAVMO_ <i>C. albicans</i> (g).....	97
Figura 31– Processo de montagem do biossensor. CVs de polimerização TAA registrados em 20 mL de HCl 0,1 M, taxa de varredura potencial: 100 mV s ⁻¹ (a). Caracterização EIE da plataforma em cada etapa de montagem (b); Inserção: Circuito equivalente adotado para ajustar os dados de impedância.....	98
Figura 32–Gráficos de Nyquist do biossensor baseado em peptídeo após exposição a diferentes concentrações (10 ¹ a 10 ⁶ UFC mL ⁻¹) de espécies patogênicas de <i>Candida</i> : <i>C. albicans</i> (a), <i>C. tropicalis</i> (b), <i>C. glabrata</i> (c) e <i>C. Krusei</i> (d).....	99
Figura 33– $\Delta R_{ct}\%$ (a) e cobertura da superfície microbiana “ $\theta\%$ ” (b) do sistema biossensor após exposição a diferentes concentrações de cepas de <i>Candida</i> . Todos	

os dados experimentais usados para calcular $\Delta R_{ct}\%$ e θ são mostrados na Tabela 2.....	102
Figura 34–Gráfico 3D para os valores de n, Q e Rct mostrados na Tabela 2.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–Valores dos elementos de circuito equivalentes a partir dos resultados da impedância ajustada.....	91
Tabela 2–Valores dos elementos de circuito equivalente a partir dos resultados da impedância ajustada.....	101
Tabela 3– Comparação de plataformas de sensores desenvolvidas para detectar <i>Candida spp.</i> com o presente trabalho.....	104

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- AFM- Microscopia de Força Atômica (*do inglês Atomic Force Microscopy*)
- APTES- Aminopropiltriétoxisilano
- BNT- Bionanotecnologia
- BEs- Biossensor eletroquímico
- CTM- Células-tronco mesenquimais
- CTM-CUM- Células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano
- ConA- Concanavalina A
- CFU- Unidade Formadora de Colônia (*do inglês Colony forming unit*)
- EIE- Espectroscopia de Impedância eletroquímica
- DMEM- Dulbecco modificação de meios essenciais mínimos (*do inglês modification of minimum essential media*).
- DMSO- dimetilsulfóxido
- FLPII- Fenilalanina-Lisina-Prolina-Isoleucina-Isoleucina
- GW- Geléia de Wharton
- LPS- lipopolissacarídeos
- MEC- Matriz extracelular
- MTT- [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]
- NM- Nanomateriais
- NPs- Nanopartículas
- NPsTiO₂- Nanopartículas de dióxido de titânio
- NSH- N-hidroxisuccinimida.
- nm- Nanômetros
- PVA- Álcool polivinílico
- PTAA- Poli (ácido-3-tiofeno acético)
- PAMs- Peptídeos antimicrobianos
- QS- Quitosana
- RcT- Resistência à transferência de carga
- SAMs- Monocamadas auto-montadas (*do inglês Self-assembled monolayers*)
- TiO₂- Dióxido de titânio
- VC- Voltametria cíclica
- WGA- Aglutinina de germén de tripo (*do inglês Wheat gearm agglutin*).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Geral	22
1.1.2 Específicos	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Engenharia de tecidos.....	24
2.1.1 Biomateriais.....	25
2.1.1.1 Polímeros.....	26
2.1.2 Moléculas bioativas.....	30
2.1.2.1 Lectinas.....	38
2.1.2.2 Peptídeos antimicrobianos (PAMs).....	39
2.1.3 Células-tronco.....	44
2.2 Obtenção de novos materiais para aplicações em engenharia de tecidos.....	49
2.2.1 Eletrofição.....	49
2.2.2 Aplicação de materiais eletrofiados na engenharia de tecidos.....	55
2.3. Nanomateriais e Biossensores.....	57
2.3.1 Nanotecnologia.....	57
2.3.2. Biossensores.....	63
2.3.2.1 Biossensores baseados em PAMs.....	68
2.4 Técnicas de Caracterização.....	70
2.4.1. Espectroscopia de Impedância eletroquímica.....	70
2.4.2. Voltametria Cíclica.....	74
2.4.3. Microscopia de Força Atômica.....	76
2.4.4. Teste de Viabilidade celular (MTT).....	79
3 METODOLOGIA.....	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	88
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	106
REFERÊNCIAS.....	108

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NO BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL.....	133
APÊNDICE B – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL (INPI).....	141
ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE	178

1 INTRODUÇÃO

A Bionanotecnologia (BNT) é definida como o subconjunto da nanotecnologia associada ao uso de componentes biológicos para o desenvolvimento de tecnologias em escala nanométrica. Ao longo deste século, a sociedade vem se beneficiando com o desenvolvimento da BNT, devido as potenciais aplicações em medicina, agricultura, eletrônica, cosméticos, meio ambiente, etc. Dentre as principais aplicações podemos citar, a criação de sistemas de liberação controlada de fármacos, sistemas de detecção de biomarcadores, nanossensores e o uso na restauração de tecidos e órgãos em engenharia de tecidos (Faria-Tischer & Tischer, 2012; Lee & Moon, 2020).

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de nanoestruturas voltadas para a área de bionanotecnologia. De forma mais específica, as nanoestruturas estão contidas na produção dos biossensores e da engenharia de tecidos. No desenvolvimento destes trabalhos foram utilizadas técnicas eletroquímicas, de eletrofiação, microscopias eletrônicas, entre outras.

Inicialmente, apresentamos o desenvolvimento de nanofibras compostas por polímeros naturais e/ou sintéticos produzidos pela técnica de eletrofiação, que consiste na produção de fibras com tamanhos nano e micro a partir de fios eletricamente carregados provenientes de soluções poliméricas. Posteriormente, investigamos a aderência e comportamento proliferativo de células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de cordão umbilical humano nas nanofibras produzidas. As CTMs se destacam por serem multipotentes e autorrenováveis, sendo encontradas em quase todos os tecidos celulares, e dotadas de capacidade de se diferenciar em linhagens celulares como adipócitos, condrócitos e osteoblastos (Chen et al., 2016; Assis-hibas et al., 2018). Assim, foram testadas 5 composições de nanofibras diferentes, incluindo o álcool polivinílico (PVA) e quitosana, como polímeros. Ademais, foram utilizadas as lectinas Concanavalina A (ConA) e a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) como agentes bioativos. As lectinas são proteínas de origem não-imune que se ligam de forma reversível a carboidratos presentes nas superfícies celulares e estudos já relataram que estas são capazes de mediar processos de reconhecimento célula-célula e célula- matriz extracelular,

adesão e diferenciação celular (Nascimento et al., 2012; Ghazarian et al., 2011; Chan et al., 2012).

O segundo sistema apresentado neste trabalho trata do desenvolvimento de um biodispositivo para auxiliar no diagnóstico de Candidemias. É uma condição clínica que depende da imunidade do hospedeiro e da colonização anormal de espécies de *Candida* (Pappas et al., 2018). As unidades de terapia intensiva (UTIs) mantêm pacientes que possuem fatores predisponentes para a aquisição de candidemias, como é o caso de pacientes transplantados, em uso de quimioterápicos e antibióticos de amplo espectro, cateter venoso central e urinário (Lagunes e Rello, 2016).

Embora *C. albicans* seja o agente mais prevalente de candidemia, a epidemiologia da candidíase mudou nas últimas décadas e *Candidas não albicans* (CNA) vêm se destacando também como agentes etiológicos. Em estudos epidemiológicos realizados no Brasil, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são as mais frequentemente isoladas em hemoculturas. A *C. glabrata* tem menor incidência no Brasil, porém nos países da América do Norte e da Europa do Norte, esta espécie é a segunda mais isolada, depois da *C. albicans*. É muito importante identificar com precisão as espécies de *Candida*, pois estas possuem peculiaridades diferentes em termos de suscetibilidade a antifúngicos (Vieira de Melo et al., 2019).

Os métodos geralmente utilizados para isolamento e identificação em casos de candidemia consistem na cultura de sangue e fluidos estéreis ou na pesquisa histopatológica. Esses testes são amplamente aplicados, porém podem levar dias para se obter resultados iniciais (Ao et al., 2018; Kaur & Chakrabart, 2017; Lass-Flörl, 2017). Neste sentido, os sistemas de biossensores eletroquímicos vêm se destacando como uma alternativa promissora para a detecção de microrganismos patogênicos. Essas ferramentas inovadoras apresentam baixo custo, portabilidade, miniaturização associada ao uso de componentes nanoestruturados, sensibilidade aprimorada e garantem análise em tempo real (Singh et al., 2014; Maduraiveeran et al., 2017).

Dessa forma, buscou-se o desenvolvimento de uma plataforma biossensora nanoestruturada baseada em um filme polimerizado de poli (ácido tiofeno acético)

(PTAA), nanopartículas de TiO_2 (NPs TiO_2) aminadas e o peptídeo antimicrobiano Clavanina-MO para detecção e diferenciação de *Candida spp* patogênica.

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são biomoléculas presentes em diversos organismos, fazendo parte do sistema imune inato desses organismos e contribuindo efetivamente contra patógenos exógenos (Silva et al., 2014). Os PAMs demonstram eficiência no reconhecimento de grupos carregados negativamente da membrana celular de microrganismos, sendo assim explorados para o desenvolvimento de biossensores (Hoyos-Nogués et al., 2018).

Portanto, o presente estudo tem potencial contribuição no campo dos biossensores e da engenharia de tecidos, representando novas possibilidades bionanotecnológicas, tanto para o cultivo de células-tronco mesenquimais como para a detecção e diferenciação de *Candidas* patogênicas, podendo futuramente ser utilizado em aplicações na área médica e diagnóstica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Desenvolver nanofibras poliméricas em forma de arcabouços, como alternativas para o cultivo de células-tronco no campo da engenharia de tecidos e uma plataforma biosensora impedimétrica baseada em filme polimerizado de PTAA, NPsTiO₂ e Clavanina-MO para detecção e diferenciação de *Candida* spp patogênica.

1.1.2 Específicos

- Nanofibras poliméricas

- Produzir nanofibras de PVA, quitosana, PVA/ConA, PVA/WGA, PVA/quitosana-ConA e PVA/quitosana/WGA pela técnica de eletrofiação;
- Analisar morfologicamente a superfície das nanofibras através da técnica microscopia de força atômica.
- Isolar as células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton de cordão umbilical humano;
- Realizar o cultivo das células-tronco mesenquimais sobre as nanofibras fabricadas.
- Avaliar a citotoxicidade das nanofibras através ensaio de viabilidade celular;
- Analisar por meio da técnica de Espectroscopia de Impedância eletroquímica a relação da resistência a transferência de elétrons com a adesão e proliferação celular.

- Biossensor

- Construir um biossensor baseado em NPsTiO₂ e Clavanina-MO;
- Modificar quimicamente a superfície de NPsTiO₂;
- Preparar uma camada de poli (ácido tiofeno acético) (PTAA) sobre a superfície de ouro do eletrodo de trabalho por meio da técnica de Voltametria Cíclica;

- Preparar a plataforma biossensora formada por PTAA_ TiO₂NPs-APTES_Clavanina-MO;
- Realizar medidas através da técnica de Impedância Eletroquímicas durante a montagem da plataforma e após uso frente às amostras das espécies de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C.glabrata* e *C.krusei*;
- Caracterizar morfologicamente o biossensor através de Microscopia de Força Atômica antes e após a interação com as espécies de *Candida*;
- Definir o circuito equivalente para obtenção de parâmetros eletroquímicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Engenharia de Tecidos

O termo engenharia de tecidos apareceu pela primeira vez em 1987 em uma reunião na National Science Foundation. Em 1988 aconteceu a primeira reunião denominada de “Engenharia de tecidos” em Lake Tahoe, Califórnia. Porém, as primeiras terapias baseadas em tecidos foram criadas décadas antes, em 1962, com o desenvolvimento do primeiro substituto sintético de pele, que não obteve muito sucesso (Anitha et al., 2014).

Mais tarde, por volta dos anos 70 e 80 começaram a surgir os primeiros produtos de engenharia de tecidos bem-sucedidos. A ET emergiu no campo da medicina em 1995 com a fundação da sociedade de engenharia de tecidos em Orlando, na Flórida (Nerem, 2006; Berthiaume et al., 2011).

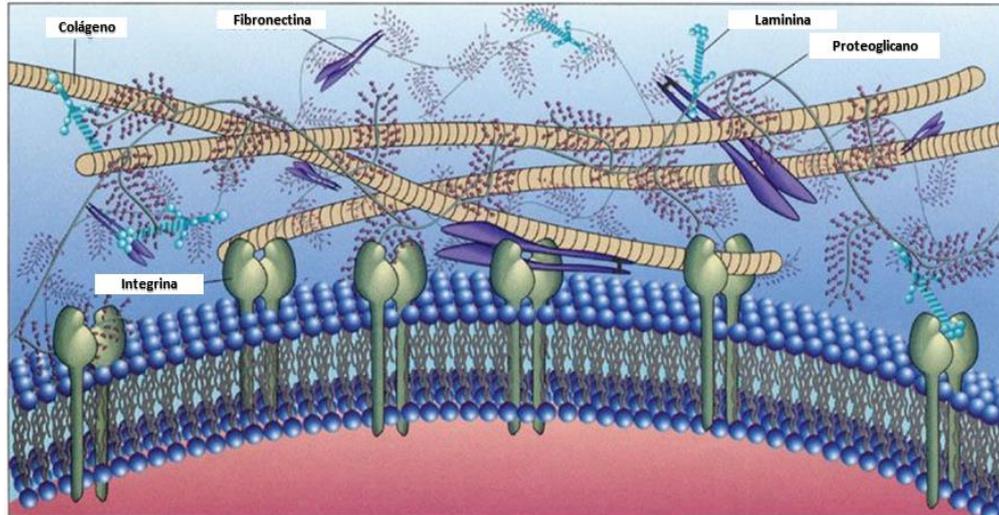
ET combina princípios de setores como a medicina, a biotecnologia, bioengenharia e ciências de materiais, entre outras, utilizando células vivas, materiais biocompatíveis e fatores bioquímicos (ex: fatores de diferenciação), bem como suas combinações para criar substitutos que possibilitem a restauração ou substituição de tecidos e órgãos lesionados, através da criação de estruturas que sejam capazes de permitir o crescimento e a diferenciação celular (Berthiaume et al., 2011; Yousefi et al., 2016; Bedian et al., 2017).

O campo da ET representa um potencial impacto na medicina, uma vez que pode significar a redução da necessidade de substituição de órgãos e acelerar o desenvolvimento de novas drogas que possibilitem a cura de pacientes sem a necessidade de transplantes de órgãos (Pati et al., 2014).

Os tecidos do corpo humano são compostos de dois constituintes principais: as células e a Matriz Extracelular (MEC) (Figura 1). Esta última é constituída principalmente por fibras com diâmetros de 50 a 500nm, cuja composição pode ser descrita pela disposição tridimensional dinâmica de polissacarídeos e polímeros naturais (colágeno, elastina, fibrinogênio) sintetizados, secretados, orientados e modificados pelos componentes celulares (Sell et al., 2010).

Fig.1 Ilustração da Matriz extracelular (MEC).

*Fonte: (<https://br.pinterest.com/pin/184155072238538883/>) /2020.



Portanto, a principal abordagem da engenharia de tecidos é projetar matrizes ou arcabouços que sejam capazes de mimetizar a MEC natural e permitir que o corpo do hospedeiro, particularmente os componentes celulares, reconheçam a matriz artificial introduzida e, por sua vez, regenere o tecido funcional “neo-nativo” (Khorshidi et al., 2015). Para isso, a ET geralmente envolve o uso da combinação entre biomateriais, células-tronco e moléculas bioativas.

2.1.1. Biomateriais

Os biomateriais se tornaram indispensáveis elementos na melhoria da saúde humana e na qualidade de vida na era moderna. As aplicações dos biomateriais compreendem a área de diagnóstico, como arranjos genéticos e os biossensores; área de suprimentos médicos, como bolsas de sangue e instrumentos cirúrgicos; área de tratamentos terapêuticos, como implantes e dispositivos médicos, assim como, a área da medicina regenerativa (He & Benson, 2017).

A definição de biomaterial mudou consideravelmente nos últimos anos. O conceito inicial de biomateriais tinha como objetivo combinar propriedades mecânicas e materiais, obtendo-se um resultado que correspondesse ao tecido nativo sem provocar danos ou resposta imune ao hospedeiro, ou seja, deveriam ser materiais totalmente inertes (Keane & Badylak, 2014). Porém, ultimamente, a ET tem se

direcionado para o uso de biomateriais que se integram ao tecido e são bioindutores, potencializando a capacidade regenerativa ou reconstrutiva de um determinado tecido ou órgão (Ma et al., 2018).

Em aplicações biomédicas, os critérios para selecionar os materiais como biomateriais são baseados em sua constituição química, peso molecular, solubilidade, forma e estrutura, hidrofília/hidrofobicidade, energia de superfície, degradação por absorção da água e mecanismos de erosão (Rodríguez-Vázquez et al., 2015).

Os principais requisitos para o uso de determinados biomateriais em engenharia de tecidos estão listados abaixo (Rodríguez-Vázquez et al., 2015):

1. Biocompatibilidade: os biomateriais devem ser aceitos pelo receptor e sua presença não deve causar mecanismos de rejeição;
2. Absorvível e degradável: com degradação controlável e taxa de reabsorção compatível com o crescimento de celular;
3. Não ser tóxico ou carcinogênico: seus produtos de degradação não podem causar efeitos adversos locais ou sistêmicos nos sistemas biológicos;
4. Quimicamente estável: não apresentar alterações químicas que possam gerar produtos tóxicos, pelo menos durante o período de regeneração do tecido;
5. Superfície quimicamente adequada: importante para facilitar o acesso, proliferação e diferenciação celular.

De acordo com a origem, os biomateriais podem ser classificados como naturais e sintéticos. Como biomateriais naturais podemos citar: proteínas, polissacarídeos (ex. quitosana), cartilagens, ossos, entre outros. Já os biomateriais sintéticos englobam polímeros, cerâmicas e metais. Neste contexto, iremos abordar os principais polímeros utilizados em ET.

2.1.1.1 Polímeros

Os polímeros utilizados em medicina regenerativa e engenharia de tecidos devem ser materiais biocompatíveis. Arcabouços poliméricos estão atraindo muita atenção devido suas propriedades únicas, tais como alta relação superfície-volume,

alta porosidade, biodegradação, boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e versatilidade química e biológica (Dhandayuthapani et al., 2011; Rodríguez-Vázquez et al., 2015).

Os polímeros podem ser naturais, sintéticos biodegradáveis e sintéticos não biodegradáveis. Dentre estes, os polímeros que são preferencialmente usados são os naturais e sintéticos biodegradáveis, uma vez que apresentam boa flexibilidade em termos de manipulação química e capacidade de se decompor em fragmentos de baixo peso molecular, podendo assim, ser eliminado ou reabsorvido pelo corpo humano (Rodríguez-Vázquez et al., 2015).

Polímeros naturais biodegradáveis foram os primeiros biomateriais a serem usados clinicamente. Estes materiais possuem propriedades bioativas que os permitem interagir melhor com as células hospedeiras por possuírem domínios moleculares específicos que podem apoiar e orientar células em vários estágios do seu desenvolvimento, apoiando positivamente a adesão e função celular. Os exemplos mais citados na literatura desses materiais são: proteínas (seda, colágeno, gelatina, fibrinogênio, elastina, queratina, actina e miosina), polissacarídeos (celulose, amilose, dextrano, quitina e glicosaminoglicanos) e os polinucleotídeos (DNA, RNA) (Dhandayuthapani et al., 2011; Asti & Gioglio, 2014; Chen, 2016).

Apesar de geralmente serem biocompatíveis, os polímeros naturais apresentam algumas limitações referentes a propriedades mecânicas e estabilidade térmica. Polímeros sintéticos, mesmo não apresentando total biocompatibilidade, podem ser processados de amplas formas facilmente obtidas, além de resistirem a altas temperaturas impostas e serem mais estáveis contra ação de microrganismos. Dessa forma, o desenvolvimento de materiais poliméricos baseados em misturas de polímeros naturais e sintéticos resultam em produtos biocompatíveis e com boas propriedades térmicas e mecânicas (Sionkowska, 2011; Rogovina, 2016).

Os polímeros sintéticos mais utilizados em regeneração de tecidos são os poli (α -hidroxiácidos), que incluem o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), seu copolímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli-caprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) e álcool polivinílico (PVA). Dentre os citados, aqueles que possuem uma ampla aplicação biomédica devido suas fibras em

micro/nanoescala semelhantes a MEC, processabilidade atraente e biocompatibilidade estão: PLGA, PEG, PCL, PVA e PVP (Chen & liu, 2016). Abaixo estão descritos os polímeros utilizados neste trabalho:

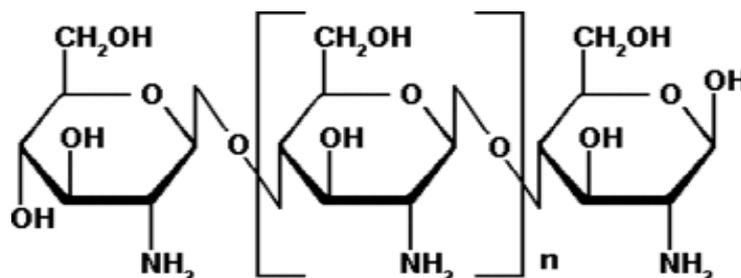
- Quitosana

A Quitosana (QS) [poly-(β -1/4) -2-amino-2-desoxi-D-glucopirranose] trata-se de um copolímero constituído da ligação dos monômeros D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina através de ligações β 1-4 (Figura 2), no qual a glucosamina é a unidade de repetição predominante na sua estrutura. QS é um derivado natural, parcialmente desacetilado, da quitina e componente da matriz extracelular nativa. É insolúvel em água, soluções aquosas, ácidos concentrados e solventes orgânicos comuns, mas é totalmente solúvel quando agitado em soluções de ácido acético, ácido nítrico, entre outros (Kanimoshi et al., 2016; Rodríguez-Vázquez et al., 2015).

A QS é extensivamente utilizada para preparação de suportes porosos para cartilagem em ET. No entanto, a fraca resistência mecânica das matrizes preparadas a partir de quitosana significa um grande obstáculo para a sua aplicação clínica. Um método eficaz para superar essas desvantagens da QS tem sido misturá-la com outro polímero. Como exemplo, a mistura de PVA e QS tem apresentado bons resultados porque ambos são substâncias polares, ricos em grupos hidroxila (-OH), os quais tendem a formar ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares. As ligações de hidrogênio entre os grupos-OH destes polímeros tende a aumentar a estabilidade e subsequentemente a miscibilidade entre eles (Rodríguez-Vázquez et al., 2015; Kanimoshi et al., 2016).

Fig.2 Estrutura Química da Quitosana.

*Fonte: (<https://pt.wikipedia.org/wiki/Quitosana>) /2018.



A quitosana inicialmente era utilizada em aplicações biomédicas, como a produção de curativos, auxílio na perda de peso corporal e na engenharia de tecidos. Ultimamente, a QS tem se tornado candidata proeminente para o uso em sistema de liberação controlada de fármacos e devido sua propriedade de adesividade, aderindo com facilidade a tecidos moles / duros, a quitosana vem sendo utilizada em muitas aplicações nos ramos da ortopedia, odontologia, oftalmologia e cirurgia (Ali & Ahmed, 2018).

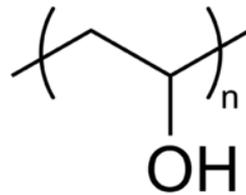
- Álcool Polivinílico

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero sintético com hidrofiliçidade, devido a presença de inúmeros grupos -OH em sua estrutura (Figura 3), portanto, solúvel em água após 30' em temperatura de $\sim 80^{\circ}\text{C}$. O PVA é obtido através da hidrólise do acetato de polivinila. Ele tem sido muito aplicado nos setores industrial, comercial, médico e alimentício, usado para produção de resinas, fios cirúrgicos e embalagens de alimentos, que geralmente estão em contato com a comida. Trata-se de uma imitação biodegradável de polímeros naturais e vem sendo usado por muito tempo em misturas com outros polímeros naturais por suas características formadoras de filmes (Karimi & Navidbakhsh, 2013; Kumar & Han, 2016; Gaaz et al., 2015).

O PVA está entre os mais usados polímeros sintéticos devido às suas propriedades únicas. Apresenta biodegradabilidade e excelente biocompatibilidade. Este é fisiologicamente inerte em termos de toxicidade aguda e não é irritante para pele nem mucosas. Apresenta barreiras notáveis contra óleos e gorduras, aromas e perfumes e pequenas moléculas. É um material ecológico e biodegradado por microrganismos adaptados em CO_2 e água. Além disso, o PVA possui excelente resistência mecânica, flexibilidade e estabilidade térmica. Por esses motivos, tal polímero vem atraindo crescente interesse em aplicações biomédicas, tanto como componente estrutural (ex: cartilagem artificial ou arcabouços em engenharia de tecidos), como componente funcional (sistema de liberação controlada de fármacos) (Karimi & Navidbakhsh, 2013; Kumar & Han, 2016; Kanimozhi et al., 2016).

Fig.3 Estrutura química do Álcool Polivinílico (PVA).

*Fonte: (https://fr.wiktionary.org/wiki/alcool_polyvinylique)/2018.



2.1.2 Moléculas bioativas

As moléculas bioativas são representadas por diversos tipos de moléculas solúveis capazes de interagir e modular a atividade de uma célula. Entre elas podemos citar os hormônios, as citocinas, os fatores de crescimento, entre outros (Singh et al., 2013). Dessa forma, podemos considerar como moléculas bioativas bastante utilizadas na bionanotecnologia, as lectinas e os peptídeos antimicrobianos. Neste capítulo, daremos enfoque às lectinas como as principais moléculas bioativas do presente estudo.

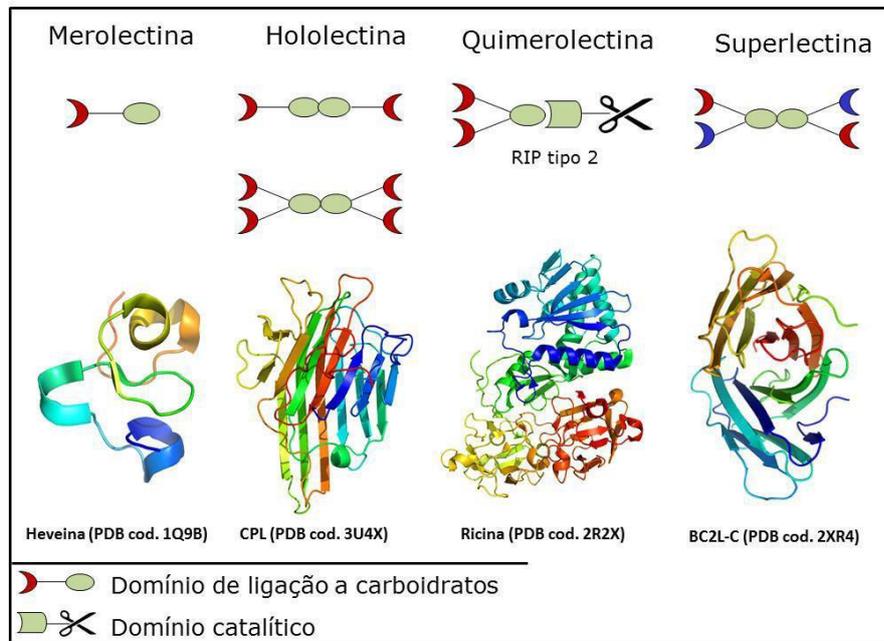
2.1.2.1 Lectinas

As lectinas são proteínas que se caracterizam por sua capacidade de ligação a glicanos, como manose, galactose, N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina, fucose, ramnose, na presença ou ausência de cátions divalentes com especificidade significativa. Através da interação com açúcares, elas desencadeiam vários processos celulares. As suas funções podem ser expressas tanto em animais, como em plantas e microrganismos (Ghazarian et al., 2011; Hamid et al., 2013; Hivrale & Ingale, 2013).

Lectinas podem ser classificadas com base na sua especificidade por hidratos de carbono e de acordo com suas estruturas globais em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 4). E ainda, podem ser agrupadas em famílias diferentes, tais como: lectinas de leguminosas, lectinas inativadoras de ribossomos tipo II, lectinas monocotiledôneas de ligação à manose, entre outras (Hamid et al., 2013; Da Silva, 2014).

Fig.4 Classificação das lectinas de acordo a estrutura.

*Fonte: (<https://docplayer.com.br/79122206-Universidade-federal-do-ceara-centro-de-ciencias-departamento-de-bioquimica-e-biologia-molecular-claudener-souza-teixeira.html>)/2019.



As merolectinas são proteínas que contêm apenas um domínio de ligação a carboidratos. Devido à sua natureza monovalente, este grupo de lectinas não promove aglutinação de células. Hololectinas são lectinas que são compostas de duas ou mais ligações de hidratos de carbono idênticas ou homólogas, podendo aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados (Ex: maioria das lectinas vegetais). As superlectinas são compostas de pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos que reconhecem estruturas de carboidratos estruturalmente não relacionadas. Por fim, o grupo de quimerolectinas compreende todas as lectinas que são compostas de um ou mais domínios de ligação a carboidratos fundidos a um domínio que exerce uma atividade biológica (Vandenborre et al.,2011).

A interação de lectinas com os carboidratos selecionados pode ser tão específica quanto a interação entre antígeno e anticorpo ou substrato e enzima. Elas se ligam não apenas a oligossacarídeos de superfície celular, como também interagem com glicanos flutuantes, incluindo monossacarídeos, porém, de forma mais fraca (Ghazarian et al., 2011).

As lectinas estão envolvidas em uma enorme variedade de acontecimentos biológicos e conseqüentemente. Estudos já relataram que tais proteínas mediam os seguintes processos: reconhecimento célula-célula e célula-ECM, diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração, apoptose, imunodulação e inflamação, indução de resposta mitogênica, efeitos antiproliferativos em células tumorais, entre outros (Nascimento et al., 2012; Ghazarian et al., 2011; Chan et al., 2012).

Adicionalmente, lectinas são capazes de melhorar a proliferação e o crescimento celular. É o caso da lectina jacalina, uma proteína de ligação ao β -galactosídeo, que induz a proliferação de linfócitos T e, ainda, a lectina de amendoim e de cogumelo, as quais estimulam a proliferação de células vasculares (Mikkola et al., 2013).

Lectinas estão presentes nos vegetais em grandes concentrações, exibindo uma variedade de atividades biológicas, incluindo a ação antibacteriana, antiviral, antifúngica e inseticida, além de agirem como proteínas de defesa para plantas contra a invasão de organismos prejudiciais (Chan et al., 2012).

Desde o final dos anos 90, as lectinas de plantas são utilizadas para provar a existência de estruturas específicas de carboidratos que diferenciam células e tecidos. A partir destas, foi evidenciado que o padrão de glicosilação de proteínas celulares é influenciado por alterações fisiológicas, como a presença de uma doença e que a população de carboidratos alterada de uma dada glicoproteína pode ser usada, portanto, do diagnóstico de tal doença (Paleček et al., 2015).

Entre as lectinas vegetais, as de leguminosas têm sido as de maior interesse. Estas lectinas são abundantes nas sementes e pertencem a um grupo de proteínas altamente homólogas. Destacam-se no estudo de base molecular e especificidade das interações proteína-carboidrato e também na compreensão do reconhecimento célula-célula, adesão, disseminação de tumores, infecção viral e inflamação (Largada-Diaz et al., 2017; Varejão et al., 2010).

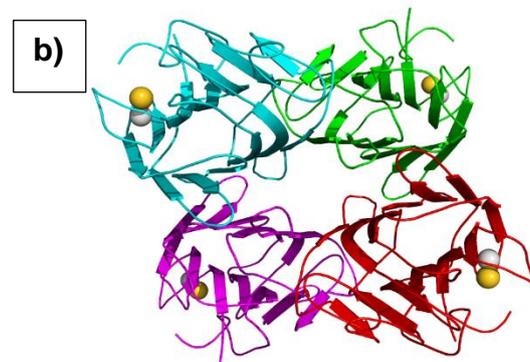
A primeira lectina de leguminosa a ser purificada em larga escala e acessível ao comércio foi a Concanavalina A (ConA), extraída das sementes da *Canavalia ensiformes* (figura 5a), conhecida popularmente como “feijão-de-porco”, em 1916. Esta lectina é $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependente e de ligação à manose/glicose. O monômero da ConA é composto de 237 resíduos de aminoácidos que formam 2 folhas- β

antiparalelas e por uma terceira folha- β que fica na parte superior, ou seja, uma folha dorsal com seis fitas, uma folha frontal com sete fitas e uma folha superior com 5 fitas. Dois monômeros de ConA de maneira adjacente e antiparalelos foram um dímero. Da mesma forma o tetrâmero é formado por dois dímeros (Figura 5b). Tal organização estrutural é dependente de pH. Quando o pH está acima de 5.5, existe um tetrâmero, caso contrário, um dímero (Li et al., 2011; Hivrale & Ingale, 2013).

Fig.5 a) Imagem das sementes de *Canavalia ensiformes* ou “feijão de porco”.

*Fonte:(<https://www.etsy.com/listing/546726667/canavalia-ensiformis-white-sword-beans/>)/2019. **b)** Estrutura tridimensional do tetrâmero da Concanavalina A.

*Fonte:(https://www.wikiwand.com/pt/Concanavalina_A/)/2019.



A ConA é uma lectina capaz de reconhecer, de forma específica, vários resíduos de glicose e manose presentes em diferentes estruturas. A partir dessa interação, tal lectina pode provocar diversas respostas celulares. Dessa forma, existem relatos que a ConA consegue imitar a capacidade da insulina, melhorando o transporte de glicose e inibindo a atividade da adenilato ciclase (Lin & Levitan, 1991). Assim como, estudos já demonstraram que a lectina de *Canavalia ensiformes* consegue controlar populações de células tumorais direcionando-as à apoptose,

autofagia e anti-angiogênese, o que a torna um potencial agente antineoplásico na terapia contra o câncer (Li et al., 2011).

Algumas lectinas podem exercer efeitos imunológicos, influenciando em vias inflamatórias. A ConA demonstrou o efeito de interferir no balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias de forma dose-dependente (Xu et al, 2006). Tal lectina, também tem o poder de afetar uma variedade de propriedades em diferentes tipos celulares, como nos neurônios, aumentando sua capacidade de plasticidade neuronal, assim como, pode promover a morte de células tumorais por autofagia, a partir da sua ligação à glicoproteínas da membrana celular e, subsequente, ativação linfocitária (Lin & Levitan, 1991; Yau et al., 2015).

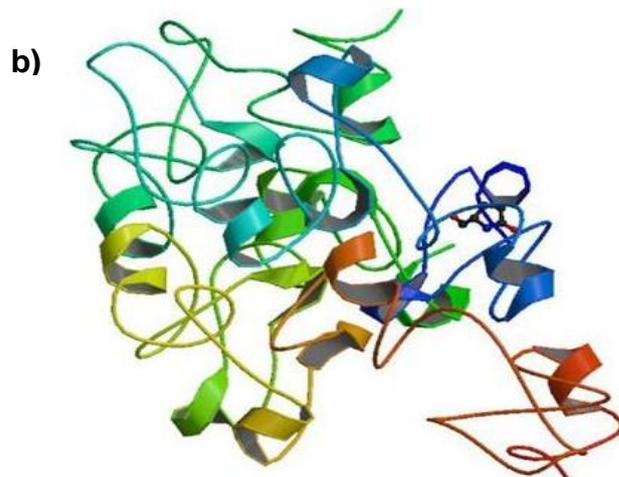
Adicionalmente, a ConA entre outras lectinas, vêm se destacando numa área que combina a nanotecnologia com a glicobiologia (Gliconotecnologia), devido a associação de glicoproteínas a nanomateriais, como nanopartículas e polímeros, para o desenvolvimento de plataformas multivalentes aplicadas na construção de biossensores, dispositivos para liberação controlada de fármacos, arcabouços, entre outras aplicações biomédicas (Roy et al., 2013; Kim et al., 2013). Nesse contexto, Oliveira, Correia & Diniz (2009) apresentaram a proposta de um biossensor composto por um eletrodo de ouro modificado com Concanavalina A imobilizadas em nanopartículas de ouro para detecção de glicoproteínas séricas de pacientes infectados pelo vírus da dengue, utilizando técnicas eletroquímicas para a avaliação da resposta sensora. Mais recentemente, Chowdhury et al (2018) desenvolveram um biossensor eletroquímico para rápida detecção de células cancerígenas utilizando uma plataforma composta por um eletrodo de ouro revestido com um nanocompósito de ConA ligadas a nanopartículas de Fe_3O_4 . E ainda, dentre as aplicações gliconotecnológicas, citamos a produção de nanofibras supramoleculares, constituídas pela complexação de nanofibras de manose automontadas com Concanavalina A, as quais foram capazes de se ligar fortemente a superfícies de células T, promovendo a ativação destas, por meio de interações multivalentes (Kim et al., 2013).

Outro exemplo de lectina vegetal comumente estudada, é a aglutinina do gérmen de trigo (*Triticum vulgare*) ou WGA (Wheat germ agglutinin). Esta lectina tem afinidade com o açúcar N-acetilglucosamina e seu dímero NN'-diacetilquitobiose,

assim como ao ácido siálico, em superfície celular (Allen, Neuberger & Sharon, 1973; Kim et al., 2016).

A lectina WGA tem uma estrutura dimérica, apresentando cerca de 171 resíduos de aminoácidos. É composta por 4 domínios e cada domínio é estabilizado por 4 pontes dissulfeto, altamente conservadas. Quando associadas as duas subunidades, 4 pares de contatos são estabelecidos, formando 8 interfaces locais e 4 tipos de sítios de ligação a carboidratos (Figura 6) (Kim et al., 2016).

Fig.6 a) Imagem de panículas de gérmen de trigo. *Fonte: (<https://www.kelisema.it/gluplex-les-2/>)/2019. b) Estrutura tridimensional da lectina WGA. *Fonte (<https://www.researchgate.net/figure/Cy5-Lectin-labeling-ratio-per/>)/2019.



A aglutinina do gérmen de trigo (WGA) é uma lectina bem conhecida por sua capacidade de aglutinar vários tipos de células animais, como eritrócitos e outros tipos de células (Wright, 1977; Dabauvalle et al., 1988). A aglutinação é uma propriedade

comum a várias lectinas e é resultado da formação de um complexo específico entre a lectina e uma macromolécula receptora presente na superfície celular (Wright, 1977).

A WGA foi a primeira proteína relatada como capaz de diferenciar células saudáveis de células tumorais. Desde então, esta lectina tem sido amplamente utilizada em aplicações biomédicas e bioquímicas. Dentre suas principais propriedades estão: mucoadesão, citoadesão, citoinvasão e propriedades de transcitose em epitélio alveolar e intestinal. Sendo assim, amplamente utilizada na pesquisa de liberação controlada de fármacos por ser uma das lectinas menos imunogênicas, possuir boa biocompatibilidade e direcionar as funções dos sistemas de entrega (Portillo-Télez et al., 2011; Yu & Pishko, 2011; Murata et al., 2013).

Em virtude das propriedades citadas, a lectina WGA foi utilizada na modificação da superfície de lisossomos de carbopol, permitindo a sua retenção eficaz na membrana intestinal de ratos e melhorando a absorção oral de uma dada droga peptídica aprisionada dentro dos lisossomos (Murata et al., 2013). Da mesma forma, Glavas-Dodov et al. (2013) demonstraram o uso da WGA na funcionalização de micropartículas de quitosana-Ca-alginato carregadas com partículas de 5-fluorouracil, melhorando a especificidade da entrega do sistema para células cancerígenas de cólon intestinal.

A lectina de *Triticum vulgare* também pode ser empregada no desenvolvimento de biossensores. Yang et al. (2015) fabricaram um biossensor por quimioluminescência eletrogerada para detecção de células cancerígenas da próstata, constituído por um anticorpo específico da próstata, como sonda de captura, e a WGA (marcada com rutênio), como sonda de sinal. Esta foi elencada para o experimento por ser de fácil acesso, comparando-se com um anticorpo, e por ter afinidade com células através da capacidade de ligação à N-acetilglucosamina (GlcNAc) da superfície celular. E ainda, encontramos o emprego de tal lectina na construção de uma plataforma biossensora formada por nanomembranas tridimensionais de TiO₂ conjugada com WGA para detecção eletroquímica do câncer de mama (Zanghelini et al., 2017).

A ligação de WGA a células-tronco mesenquimais foi avaliada por Kim et al. (2016) quando sintetizaram um conjugado de hialuronato com WGA e o adicionaram

à superfície de CTMs para entrega sistêmica alvo-específica dessas células ao fígado, sendo assim um sistema com potencial para uso em terapia celular com células-tronco.

No presente trabalho, baseando-se nas propriedades das lectinas supracitadas, fizemos uso das mesmas como incremento para aperfeiçoar a capacidade de cultura, adesão e proliferação de CTMs em membranas nanofibras poliméricas, objetivando a obtenção de estruturas com possibilidade de uso no ramo de engenharia de tecidos.

- Aplicação de lectinas na engenharia de tecidos:

Quando tratamos de engenharia de tecidos, a adesão celular, a disseminação e o crescimento na superfície de biomateriais são características imprescindíveis. Alguns polímeros possuem características vantajosas para construção de arcabouços, como a quitosana, o nylon, o ácido poliglicólico, PVA, entre outros; porém, fornecem uma limitada capacidade de ligação celular, quando comparadas com fibras naturais (ex. colágeno) (Toegel et al., 2007; Toegel et al., 2013).

Neste contexto, pesquisadores passaram a considerar as lectinas como candidatas para melhoria de tais limitações pela sua capacidade de mediar bioadesão. Logo, Wang et al. (2003) demonstraram que a ligação covalente da lectina WGA a filmes de quitosana resultou na melhora adesão de fibroblastos, mediada por oligossacarídeos. A superfície do biomaterial modificada com WGA se tornou mais biocompatível promovendo a adesão celular.

Experimentos adicionais foram capazes de sugerir que tal efeito observado é dependente da especificidade célula-lectina. Utilizando dessa vez a quitosana modificada com a lectina ConA, observou-se que a mesma apresentou maior afinidade por células endoteliais, quando comparada à WGA, sendo assim, mais eficaz na promoção da interação célula-biomaterial (Wang et al., 2003; Wan & Tai, 2013).

A WGA também foi ligada covalentemente a fibroína da seda para obtenção de um arcabouço, resultando em uma adesão celular robusta e significativamente mais

elevada em comparação com a fibroína não modificada, tornando possível o uso desta em procedimentos cirúrgicos para regeneração tecidual (Teuschl et al., 2014).

Sabe-se que o transplante de CTMs, condrócitos, osteoblastos e células musculares é complicado, uma vez que tais células aderem mal, dependendo do material do arcabouço e, geralmente, são danificadas por proteases ou estímulos mecânicos no local do transplante. Baseando-se nisso, Nishimura et al. (2004) descobriram que as células citadas quando expostas à lectina eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) e à ConA foram capazes de aderir favoravelmente a materiais de ácido poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)-PGLA, titânio, hidroxiapatita e plástico, apresentando também, resistência a proteases e a estímulos mecânicos.

Outros tipos de lectinas também já foram aplicados em estudos na área de engenharia de tecidos. As galectinas, por exemplo, são lectinas endógenas com elevado poder de adesão e efeito regulador de crescimento celular. Cientistas comprovaram que tais lectinas induzem a conversão de fibroblastos dérmicos humanos em miofibroblastos, assim como, são capazes de produzir uma matriz extracelular bioativa, ou seja, um arcabouço bastante adequado para a cultura de células (Dvořánková et al., 2011., Lin et al., 2015).

2.1.2.2 Peptídeos Antimicrobianos

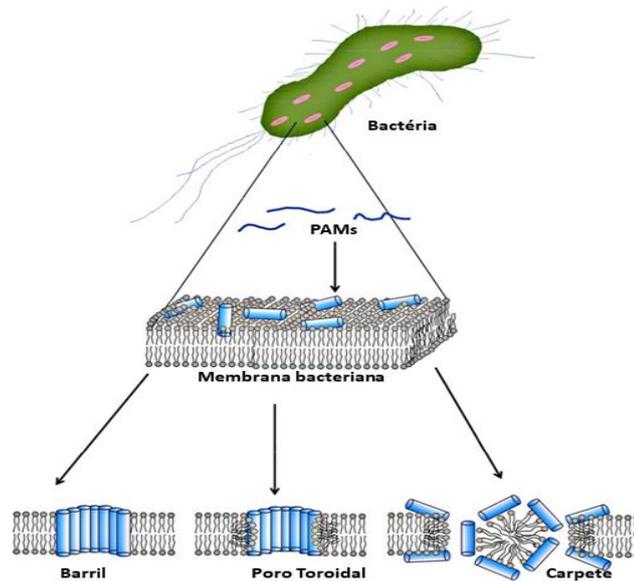
Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são considerados antibióticos naturais produzidos por animais, plantas, protozoários, fungos e bactérias, fazendo parte do sistema imune inato desses organismos e contribuindo contra patógenos exógenos. Os PAMs contêm cadeias catiônicas (carregadas positivamente) formadas por 5-50 aminoácidos e apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. Esse tipo de biomolécula pode ter um efeito anfifílico, exibindo regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, enquanto interagem com membranas celulares bacterianas (Silva et al., 2014; Biswaro et al., 2018).

Muitos PAMs contêm uma fração substancial de resíduos hidrofóbicos que aparecem frequentemente a cada 3-4 unidades de aminoácidos. Conseqüentemente, formam α -hélices ao interagir com as membranas lipídicas. Portanto, embora esses peptídeos afetem as bactérias de muitas formas diferentes, incluindo a inibição da

parede celular, síntese de DNA, RNA e proteínas, considera-se a ruptura das membranas plasmáticas como o seu principal modo de ação (Schmidtchen et al., 2014). Contudo, o mecanismos de ação dos PAMs ainda não estão totalmente elucidados. Acredita-se que existem maneiras diferentes de inserção desses peptídeos na membrana, diretamente relacionadas à concentração e natureza do PAM (Corrêa et al., 2019).

Diferentes mecanismos de ação têm sido propostos para os PAMs, sendo três os mais aceitos pela comunidade científica: barril, tapete e toroidal (Figura 7). No modelo de barril, a parte hidrofóbica dos peptídeos interage com as caudas hidrocarbonadas dos lipídios da membrana e a sua parte hidrofílica expõe-se no lúmen, resultando na formação de um poro aquoso transmembranar. O mecanismo de tapete é um modelo de permeabilização da membrana que se assemelha ao modo de ação dos detergentes. Ao contrário do modelo de barril, não há inserção de peptídeos na membrana, mas sim um acúmulo na superfície, formando um “tapete”. Devido a alta densidade de PAMs, a bicamada é desestabilizada por alterações na fluidez e, assim, entra em colapso formando várias micelas (Van't hof et al., 2001; Carvalho & Machini, 2011; Corrêa et al., 2019). Por fim, o modelo poro toroidal se diferencia do mecanismo de barril pela presença de lipídeos de membrana intercalados com os PAMs, formando um poro. Assim, a “luz” do poro mostra as superfícies polares dos peptídeos e as cabeças, também polares, dos fosfolipídeos. O resíduos de aminoácidos hidrofóbicos promovem o deslocamento das cabeças polares dos lipídeos, o que induz uma tensão na membrana. Essa tensão leva à desestabilização da superfície da membrana e conseqüente lise e extravasamento citoplasmático (Silva et al., 2014; Corrêa et al., 2019).

Fig.7 Principais mecanismos de ação dos PAMs sobre a membrana bacteriana. Fonte: Adaptado de Lee & Park (2014).



Uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos tem se destacado em estudos como agentes antimicrobianos, os peptídeos isolados de invertebrados marinhos são exemplos disso (otero-gonzalez *et al.*, 2010; Mehbub *et al.*, 2014) e como principal enfoque nesse estudo, podemos citar as Clavaninas.

As Clavaninas pertencem a uma família de peptídeos antimicrobianos que são expressos em hemócitos do tunicado marinho *Styela clava* (Figura 8). São peptídeos multipotentes, catiônicos, α -helicoidais, anfipáticos, com um comprimento de 23 resíduos de aminoácidos. Eles são excepcionalmente ricos em glicina, histidina e fenilalanina que desempenham importante papel na ação antimicrobiana da Clavanina A (ClavA). A ClavA é formada pelos seguintes resíduos de aminoácidos: VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV-NH₂ (Mandal *et al.*, 2017).

Fig.8 *Styela clava*, tunicado do qual foi isolado o PAM Clavanina. *Fonte:(https://wdfw.wa.gov/ais/styela_clava/) /2018.



A ClavA tem uma atividade antimicrobiana *in vitro* distinta em relação a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo amplamente eficaz principalmente contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (Silva et al., 2014). E ainda, devido as células de mamíferos apresentarem um alto teor de colesterol em suas membranas, não foi observada atividade citotóxica contra células humanas em testes de toxicidade aguda a qualquer concentração e houve a redução de 80% da mortalidade de camundongos infectados com *S. aureus* e *Escherichia coli* (Ribeiro et al., 2018).

A Clavanina A vem sendo bem estudada e utilizada como ferramenta biotecnológica, não só por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, já confirmada, como também, devido as suas propriedades imunomoduladoras, despertando o interesse de grupos de pesquisa que investiram numa modificação estrutural para melhoria de tais propriedades (De Miranda et al., 2017; Ribeiro et al., 2018; Kang et al., 2019).

A modificação consistiu na inserção do oligopeptídeo hidrofóbico FLPII, o qual está presente em um grande número de peptídeos com atividade imunomoduladora, assim como, em proteínas conhecidas por interagir com diferentes tipos de membranas e organelas, denominadas lipocalinas vegetais. Os resíduos de aminoácidos FLPII foram incorporados na extremidade N-terminal da Clavanina A e a nova molécula passou a se chamar Clavanina-MO (FLPIIVFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV-NH₂) (Silva et al., 2016).

O peptídeo modificado apresentou atividade antimicrobiana aumentada, conferindo proteção contra infecções letais causadas por patógenos Gram-positivos e Gram-negativos em modelos animais, e uma série de atividades imunomoduladoras. E ainda, não exibiu citotoxicidade *in vivo* e *in vitro* contra eritrócitos, monócitos e fibroblastos (Silva et al., 2016).

- PAMs e suas aplicações

Entre as diversas aplicações dos peptídeos antimicrobianos podemos citar algumas de maior interesse, como: controle de conservação de alimentos, criação de animais, sistemas de liberação controlada e biossensores (Silva et al., 2014).

O uso de PAMs como conservante se mostrou bastante vantajoso na indústria de alimentos. As bacteriocinas estão entre os principais peptídeos utilizados para tal fim. Estas são eficazes contra bactérias Gram-positivas que geram a maioria das doenças transmitidas por alimentos (ex: *Listeria monocytogenes*). Como principal exemplo, podemos citar o Nisin, uma bacteriocina produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis*, que inibe a atividade de muitos patógenos alimentares em produtos lácteos e frutos do mar. Aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA para aplicações alimentares, é amplamente utilizado na indústria de laticínios contra deterioração de clostrídios em queijo duro e semiduro processado, queijo spreads e sobremesas lácteas (Keymanesh, Soltani, & Sardari, 2009; Krivorotova et al., 2016).

Além da indústria de produção de alimentos, os PAMs têm atraído atenção também para a criação de suínos e aves. Alguns peptídeos artificiais, como o A3, P5 e cecropina AD tiveram efeitos benéficos no desempenho do crescimento, digestibilidade dos nutrientes, morfologia e microbiota intestinal de porcos. E ainda, a administração de PAMs extraídos de intestino de porco na água potável ou na ração é capaz de promover o crescimento de frangos de corte, assim como, peptídeos de porco demonstraram melhorias na função do intestino delgado de frangos (Wang et al., 2016; Hu et al., 2016).

Quando se trata da aplicação dos PAMs em sistemas de liberação controlada de fármacos, vários obstáculos são considerados em relação à sua entrega eficiente

e segura. Como exemplo, podemos citar o fato que o tecido infectado é rico em atividade proteolítica, mediado tanto por proteases bacterianas como por proteases de células de defesa humana. Assim, a menos que o PAM tenha sido projetado para ser proteoliticamente estável, a administração em pacientes com fibrose cística pulmonar, feridas crônicas ou olhos infectados, provavelmente resultam em rápida degradação e perda de atividade dos peptídeos antimicrobianos (Nordström & Malmsten, 2017).

A crescente compreensão das atividades dos agentes fisiológicos, bem como a evolução de peptídeos sintéticos, aumentou-se o potencial de uso dos PAMs. Além disso, a aplicação da junção destes peptídeos com estratégias nanotecnológicas para seu direcionamento e entrega sistêmica, melhorou a estabilidade dos peptídeos na formulação, na eficiência, na estabilidade contra degradação proteolítica e acesso ao local da doença. Isso proporcionou o aumento da relação risco-benefício dos PAMs (Schäfer-Korting & Rolff, 2018). Como exemplo, Groo et al (2018) demonstraram que PAMs podem ser entregues com sucesso em nanocápsulas lipídicas formadas por um núcleo de triglicerídeos cercado por um envoltório surfactante, usando micelas reversas carregadas de PAMs. Os resultados evidenciaram alta eficiência de carregamento e peptídeos com atividade preservada e resistentes a proteases.

Embora os PAMs possuam diversos mecanismos de ação antimicrobiana, seus principais alvos são as membranas citoplasmáticas. Em geral, eles estabelecem interações eletrostáticas com lipopolissacarídeos (LPS) e outras moléculas carregadas negativamente da membrana bacteriana. A eficiência dos PAMs no reconhecimento dos grupos fosfato de LPS tem sido explorada para desenvolver ensaios de biossensores para detectar, classificar e quantificar bactérias, assim como, fungos e protozoários. Do ponto de vista da engenharia, os peptídeos antimicrobianos têm propriedades desejáveis para o desenvolvimento de biossensores. Eles podem ser sintetizados através de métodos automatizados, a baixo custo e em grandes quantidades. Além disso, podem se ligar a grupos químicos para funcionalizar seletivamente diversas superfícies (Hoyos-Nogués et al., 2018).

Liu et al. (2016) relataram o uso de peptídeos antimicrobianos sintéticos como novos agentes de reconhecimento, permitindo a detecção de patógenos bacterianos.

A montagem do biossensor foi orientada na superfície de eletrodos através de um resíduo de cisteína, associado à detecção impedimétrica. A detecção foi rápida e sensível para quatro cepas bacterianas, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Silva Junior et al. (2018) desenvolveram uma plataforma nanoestruturada sensível baseada em monocamada auto-montada de Cisteína, modificada com nanopartículas de ouro, utilizando como agente de biorreconhecimento o PAM Clavanina A. Foram utilizadas as técnicas de EIE e voltametria cíclica para detecção das seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, obtendo um limite de detecção de 10^1 CFU mL⁻¹. Zhou et al. (2018) demonstraram um biossensor que utilizou o PAM Magainin I como elemento de reconhecimento para detecção de *E. coli* O157:H7 em água e suco e obtiveram um baixo limite de detecção de 5×10^2 CFU/mL da cepa citada. E ainda, recentemente, Malvano, Pilloton, & Albanese (2020) construíram um biossensor impedimétrico baseado no PAM Nisina para detecção direta de bactérias patogênicas e não patogênicas que se mostrou seletivo para *Salmonella spp.*

No presente trabalho, um peptídeo antimicrobiano modificado foi utilizado como agente de biorreconhecimento de uma plataforma baseada em nanopartículas de TiO₂ aminadas para detecção e classificação de fungos do gênero *Candida*.

2.1.3 Células-tronco

A combinação de arcabouços e células e/ ou moléculas biologicamente ativas é o fator primordial para o sucesso da engenharia de tecidos, uma vez que tal junção culmina com a obtenção de um produto a ser usado para promover a regeneração de tecidos (Han et al., 2014; Bartold et al., 2015). Com isso, podemos destacar as células-tronco como importantes elementos no desenvolvimento de pesquisas em engenharia de tecidos.

As células-tronco (CT) podem ser definidas como unidades de organização de sistemas biológicos que são responsáveis pela regeneração e desenvolvimento de órgãos e tecidos. São células clonogênicas, capazes de autorrenovação e/ou diferenciação, dependendo de sinal intrínseco modulado por fatores extrínsecos em seu nicho (Han et al., 2013; Bocakova et al., 2018).

Apesar de representar o maior interesse da comunidade científica, os estudos com CTs embrionárias ainda são restritos em alguns países por questões ético-religiosas, logo as células-tronco adultas se tornaram fonte alternativa mais utilizada nas pesquisas com células-tronco (Machado & Leta, 2017).

As CTs são definidas por duas características principais: autorrenovação e potencial de diferenciação. Podem ser derivadas de embriões e de tecidos animais pós-natais, sendo classificadas de acordo com a sua potência de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (De Los Angeles et al., 2015; Fanta et al., 2016).

As células-tronco totipotentes são capazes de gerar todos os tecidos do organismo e dos folhetos embrionários. O zigoto é a única célula-tronco totipotente no corpo humano. CTs pluripotentes são capazes de gerar todas as linhagens celulares e de manifestar propriedades funcionais distintas, dependendo das condições sob as quais são derivadas e cultivadas. CTs multipotentes, por ex. hematopoiéticas, restringem-se a gerar os tipos de células maduras do seu tecido de origem, em circunstâncias fisiológicas normais. Por fim, as CTs unipotentes, também possuem a capacidade de autorrenovação, mas só dão origem a um tipo de célula, como é o caso do espermatozoide (De Los Angeles et al., 2015; Mahla, 2016).

CTs embrionárias são células pluripotentes derivadas da massa celular interna do blastocisto que podem ser propagadas indefinidamente em um estado indiferenciado. Já as células-tronco somáticas são células multipotentes que se diferenciam em outras linhagens celulares, as hematopoiéticas e as mesenquimais (Jiang et al., 2002; Fanta et al., 2016).

As células-tronco mesenquimais (CTM), também conhecidas como células estromais da medula ou células progenitoras mesenquimais, são células autorrenováveis, multipotentes, capazes de se diferenciar em outros tipos de células e devido sua ampla capacidade de diferenciação e ampla distribuição tecidual, tem sido ferramentas terapêuticas muito atraentes para uso em imunoterapia e medicina regenerativa, uma vez que são células facilmente cultivadas *in vitro*, aderindo ao plástico quando mantidos em condições padrão de cultura (Alhadlaq et al., 2004; Ledesma-Martínez et al., 2016; Peault et al., 2015; Najjar et al., 2019).

As CTMs de várias espécies adultas de vertebrados já demonstram serem capazes de se diferenciar em células específicas de alguns tecidos, como: condrócitos, osteoblastos, adipócitos, células musculares lisas, fibroblastos e estroma de suporte hematopoiético. E ainda, estudos também demonstraram que as CTMs têm potencial de se diferenciar em células hepáticas, renais, cardíacas e neurais (Alhadlaq et al., 2004; Batsali et al., 2013; Peault et al., 2015).

Já foram relatadas, como fontes de CTMs, a medula óssea, o tecido adiposo, prepúcio, polpa dentária, cordão umbilical, músculo esquelético, sinóvia, líquido amniótico, sangue fetal, fígado, pulmão e coração. As CTMs retiradas da medula óssea representam a população mais estudada e considerada padrão-ouro para aplicações clínicas. Porém, já ficou claro que a medula óssea pode não representar a fonte mais adequada para coleta de CTM. Além do risco de infecção e do procedimento de isolamento doloroso por aspiração da medula óssea, as CTM estão presentes em níveis muito baixos em aspirados de medula e, além disso, sua qualidade e quantidade diminuem com a idade do doador (Batsali et al., 2013; Vieira et al., 2019).

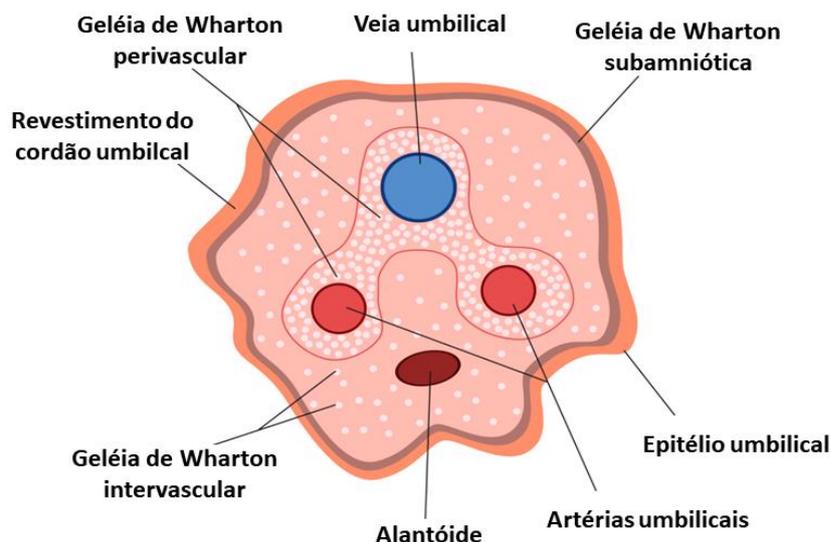
Para contornar esses obstáculos, muitos investimentos têm sido feitos na descoberta de fontes alternativas de CTM, que sejam abundantes e de fácil acesso, destinadas ao uso terapêutico. Nesse contexto, o cordão umbilical, que é considerado um desperdício médico e é obtido com um procedimento simples e seguro durante o parto, despertou a atenção de estudiosos como uma fonte promissora para o isolamento de CTM (Batsali et al., 2013; Beeravolu et al., 2017; Najar et al., 2019).

As CTMs de cordão umbilical (CTMs-CU) possuem muitas propriedades semelhantes as CTM de medula óssea, porém geralmente são consideradas uma população mais primitiva que a última. CTMs-CU demonstraram não formar teratomas em transplantes e as pesquisas não levantam questões éticas ou problemas legais (Batsali et al., 2013). Além das vantagens citadas, as CTMs-CU possui capacidade de autorrenovação rápida, se diferenciam em três camadas germinativas para se acumularem em tecidos danificados ou em regiões inflamadas para provocar reparo tecidual, possuem alta capacidade de proliferação, atividade imunomoduladora, plasticidade e são consideradas o melhor recurso para transplante alogênico. Adicionalmente, as CTMs-CU são caracterizadas por serem seguras, abundantes,

menos imunogênicas e possuir menor tempo de amplificação em comparação a outras células-tronco (Sriramulu et al., 2018).

O cordão umbilical humano é constituído por uma cobertura externa de uma única camada de epitélio amniótico que envolve um tecido conjuntivo gelatinoso, através do qual três vasos, uma veia e duas artérias, transportam sangue oxigenado e desoxigenado entre a placenta e o feto. Os vasos umbilicais compreendem apenas uma túnica íntima e média e não possui túnica adventícia (Figura 9). Os papéis adventícios, como suporte vascular e função contrátil, são realizados pelo tecido conjuntivo mucóide, denominado “geléia de wharton” (GW). A GW é um tecido conjuntivo gelatinoso composto de matriz extracelular abundante em glicosaminoglicanos (principalmente, ácido hialurônico), fibras de colágeno, miofibroblastos e matócitos ocasionais (Batsali et al., 2013; Davies, Walker, & Keating, 2017; Stefańska et al., 2020).

Fig.9 Esquemática do corte transversal de cordão umbilical humano coberto por uma camada externa de epitélio umbilical e três vasos umbilicais embutidos na geléia de Wharton. A veia umbilical e as artérias umbilicais são desprovidas de túnica adventícia. *Fonte: Adaptado de Stefańska et al. (2020).



As células estromais da geléia de Wharton são mais abundantes na proximidade dos vasos umbilicais, na geléia perivascular, tornando-se menos

abundante na geléia intervascular e em menor quantidade na geléia subamniótica. O grau de diferenciação das células estromais é mais alto próximo aos vasos e diminui gradualmente em direção ao epitélio umbilical (Stefańska et al., 2020).

Um estudo sistemático da expansão *ex vivo* de CTMs-GW mostrou que aproximadamente 360.000 células viáveis podem ser obtidas por amostra de cordão umbilical e essas células tendem a proliferar muito rapidamente e manter a atividade estável da telomerase (capacidade de replicação), características que permitem obter quantidades suficientes de células para aplicações clínicas. Na maioria dos casos, essas células são isoladas do cordão umbilical com métodos enzimáticos e cultura de explantes (Garzon et al., 2020).

O método enzimático utiliza três enzimas proteolíticas para a separação de células do tecido e uma suspensão de células é cultivada em meio apropriado para proliferação celular. Já no método de explante, nenhuma enzima é utilizada; o tecido original é excisado em pedaços menores que são colocados em frascos de cultura e as células começam a migrar para fora do tecido, aderindo à superfície do frasco de cultura (Hendijani, 2017).

Estudos demonstraram que o número de CTMs-GW obtidas pelo método de explante é maior e essas células apresentam níveis mais altos do fator de crescimento de fibroblastos (FCF) e expressa genes relevantes relacionados à mitose. Portanto, o método de explante é considerado mais eficiente em termos de viabilidade celular e número de CTMs (Yoon et al., 2013; Garzon et al., 2020).

As áreas de aplicação das CTMs-GW incluem o tratamento de deficiências neurológicas, doenças hepáticas, doenças do sistema imunológico, diabetes, lesão pulmonar, lesão renal, leucemia aguda, etc (Li et al., 2015). Nesse sentido, Musialek et al. (2015) evidenciaram a viabilidade e segurança do uso de CTMs-GW como terapia celular para uso em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Liu et al. (2017) demonstraram que CTMs-GW podem ser utilizadas para reparar defeitos de cartilagens de coelhos e seus resultados sugeriram que tais células indiferenciadas podem representar uma abordagem melhor do que as mesmas células diferenciadas induzidas por TGF- β para o tratamento *in vivo* de defeitos de cartilagem em engenharia de tecidos. Outros estudos também concluíram que quantidades suficientes de CTMs-GW, em fígados de ratos, foram capazes de promover a

secreção de citocinas, reduzir a ativação de células estreladas hepáticas, melhorar o reparo das células e curar efetivamente a fibrose hepática (Tsai, Fu & Chen, 2009). E ainda, recentemente, Hashemi et al. (2019) semearam CTMs-GW em um suporte clínico de membrana amniótica humana para avaliar a cicatrização de úlceras crônicas da pele de pacientes diabéticos, demonstrando resultados significativos em relação ao reparo tecidual e regeneração de tecidos.

Portanto, as CTMs-GW são células com grande potencial de uso na terapia celular e na engenharia de tecidos. Neste trabalho, demonstramos o uso de tais células para analisar propriedades de arcabouço de membranas de PVA, quitosana e lectinas, obtidas pela técnica de eletrofiação.

2.2 Obtenção de novos materiais para aplicações em engenharia de tecidos

2.2.1. Eletrofiação

Um arcabouço de ET serve como um substituto para a MEC natural e deve atender alguns requisitos básicos, como já citado anteriormente. Uma questão essencial é a capacidade deste biomaterial apoiar a fixação celular, assim como, facilitar o transporte de nutrientes. Portanto, tanto uma grande área de superfície como uma estrutura com poros adequados são essenciais, podendo afetar o comportamento celular (Khorshidi et al., 2015).

Entre os arcabouços disponíveis, as nanofibras são candidatas promissoras, uma vez que mimetizam o MEC nativo. Geralmente são fibras com diâmetros inferiores a $1\mu\text{m}$, possuem boas propriedades mecânicas como: alta resistência à tração, grande área de superfície, elasticidade, permitem a modificação de sua superfície, alta porosidade, grande relação área/volume, além de serem preparações simples e econômicas (Sundaramurthi et al., 2014; Thenmozhi et al., 2017; Xue et al., 2019).

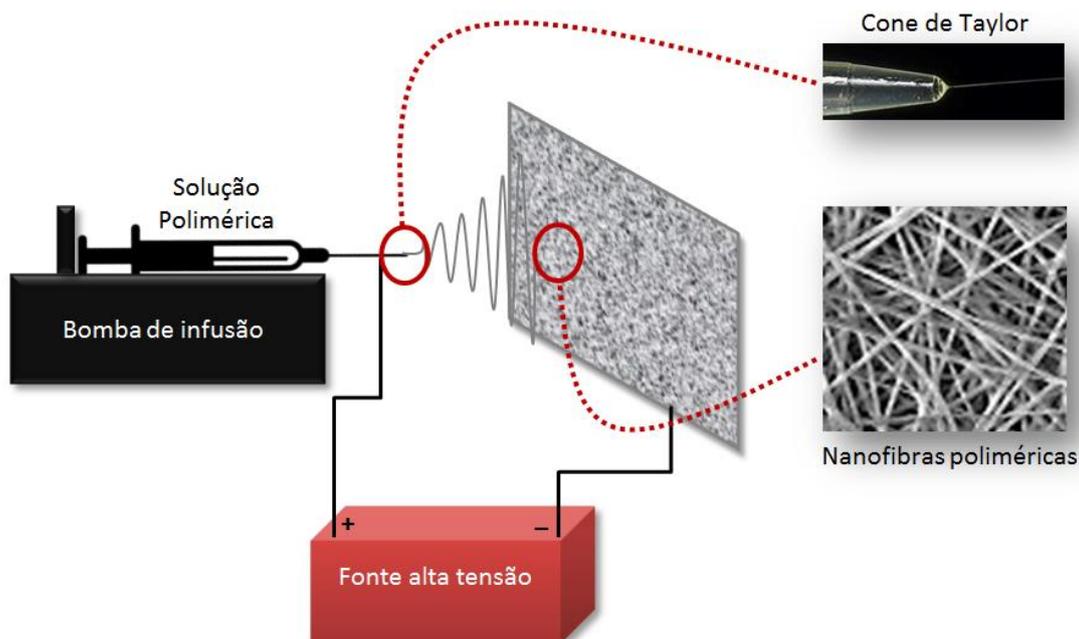
Existem várias técnicas utilizadas na fabricação das nanofibras, dentre elas estão: separação de fase induzida por temperatura, automontagem molecular, modelo de síntese, desenho e eletrofiação. Contudo, esta última parece ser uma técnica de maior interesse por sua abordagem eficiente em preparar nanofibras poliméricas a

partir de uma grande variedade de soluções de polímeros e possuir um custo efetivo (Abrigo, McArthur & Kingshott, 2014; Shabafrooz et al., 2014).

A Eletrofiação é uma técnica antiga, observada pela primeira vez em 1897 por Rayleigh, estudado detalhadamente por Zeleny em 1914 e patenteado por Formahals em 1934. Porém, só em 1969, Taylor preparou a base da eletrofiação com a obtenção de jatos acionados eletricamente. O termo “*electrospinning*” deriva de “fiação eletrostática” e começou a ser usado somente por volta de 1993 (Bhardwaj & Kundu, 2010; Xue et al., 2017).

De acordo com alguns autores, a eletrofiação é um processo pelo qual uma solução polimérica pode ser fiada em fibras de pequeno diâmetro usando um campo elétrico de elevado potencial. A aparelhagem utilizada para o processo consiste em uma fonte elétrica de alta tensão com polaridade positiva e negativa, seringa com um capilar ou agulha, uma bomba de infusão para impulsionar a solução presente na seringa e um coletor aterrado. O coletor pode ter qualquer formato, de acordo com os requisitos, como uma placa plana ou um cilindro rotativo (Figura 10) (Subbiah et al., 2005; Khorshidi et al., 2015; Kishan & Cosgriff-Hernandez, 2017).

Fig.10 Esquema da aparelhagem utilizada na técnica de eletrofiação. *Fonte: (<https://www.manutencaoesuprimentos.com.br/>)/2020.



Inicialmente, a solução do polímero é empurrada através da bomba, seja pela gravidade ou por avanço. Quando um pequeno volume de polímero líquido é exposto ao campo elétrico, a força repulsiva dentro da solução carregada torna-se maior do que a sua tensão superficial e, como resultado, é formada uma protuberância cônica, conhecida como cone de Taylor. A partir daí, um jato aparentemente reto emerge do cone, no entanto, esse segmento reto não perdura por muito tempo. O jato emerge em forma cônica e transparente, ficando sujeito a forças de arrasto, forças da gravidade, forças de repulsão Coulombiana, tensão superficial e forças viscoelásticas que atuam sobre o mesmo enquanto se dirige até o coletor. Durante o tempo que o jato leva para chegar ao coletor, o solvente evapora naturalmente e as fibras do polímero seco são depositadas (Schiffman & Schauer, 2008; Teo & Ramakrishna, 2006; Ghorani & Tucker, 2015; Xue et al., 2017).

O jato de polímero é ejetado através de forças eletrostáticas, da ponta do capilar até o coletor. A força de arrasto é imposta ao jato com alta velocidade como resultado de sua interação com o ar circundante. A expansão da gota é atribuída a força de Coulomb, enquanto a contração é devido à tensão superficial e forças viscoelásticas. A presença do campo elétrico influencia diretamente as forças de repulsão eletrostática e de Coulomb, observadas no processo (Ghorani & Tucker, 2015).

Existem vários fatores que afetam o processo de eletrofiação. Esses fatores são classificados como: parâmetros de eletrofiação, parâmetros da solução e parâmetros ambientais. Os parâmetros da eletrofiação incluem o campo elétrico aplicado, a distância entre a agulha e o coletor, taxa de fluxo e diâmetro da agulha. Os parâmetros da solução incluem o solvente, concentração do polímero, viscosidade, condutividade da solução e tensão superficial. Os parâmetros ambientais incluem a umidade relativa e a temperatura. Todos esses parâmetros afetam diretamente na formação de fibras eletrofiadas lisas e sem esferas (Haider, A., Haider & Kang, 2015).

O campo elétrico é um dos parâmetros cruciais no processo de eletrofiação. Este pode ser controlado pelo tipo de coletor e pelas características da agulha, que alteram, consideravelmente, a morfologia da fibra. Se o campo elétrico for utilizado sobre soluções mistas, um forte campo elétrico induzirá as cargas do polímero a se

moverem ou migrarem na direção oposta. Como resultado, ocorre a separação das fases da solução mista durante o processo de eletrofiação (Chen et al., 2018).

A distância entre a ponta da agulha metálica e o coletor desempenha um papel essencial na determinação da morfologia de uma nanofibra, uma vez que a mesma depende do tempo de disposição, frequência de evaporação, entre outros fatores. Alguns estudos demonstraram que nanofibras com defeitos e grande diâmetro são formadas quando a distância mantida entre a agulha e o coletor é pequena; por outro lado, o aumento da distância causa a diminuição do diâmetro da nanofibra (Haider, Haider, Kang, 2015).

A taxa na qual a solução de polímero é ejetada da agulha é tipicamente governada pela pressão hidrostática realizada pela bomba da seringa. A força necessária para entregar a solução a uma taxa constante está relacionada, principalmente, ao diâmetro da agulha e a viscosidade da solução. Se a vazão for muito baixa, a solução poderá solidificar na ponta da agulha e não será capaz de formar o cone de Taylor, devido ao fluxo insuficiente. Além disso o fluxo da solução polimérica através da ponta da agulha determina a morfologia das fibras. Por outro lado, aumentar a vazão leva a um aumento do tamanho dos poros e diâmetro da fibra, mas também pode formar grânulos; assim, para se obter uma fibra uniforme, é necessário definir uma vazão crítica para a solução polimérica específica (Sandri et al., 2020).

Os solventes preferidos para o processo de eletrofiação devem permitir a solubilização completa dos polímeros e deve ter um ponto de ebulição moderado. Geralmente, solventes voláteis são interessantes, devido evaporarem facilmente durante o vôo da ponta da agulha para o coletor (Sandri et al., 2020).

A viscosidade da solução é uma propriedade dependente de sua concentração, sendo considerada uma das maiores determinantes do tamanho e morfologia das fibras produzidas por eletrofiação. Em alguns casos, o aumento da concentração (e, portanto, da viscosidade), leva à secagem rápida da gota na ponta do capilar, impedindo o processo de formação do jato. Por outro lado, quando a concentração da solução polimérica é muito baixa, a carga elétrica sobre a tensão superficial causa a formação de cadeias poliméricas entrelaçadas que se quebram antes de chegar ao coletor (Haider et al., 2013; Kang, 2015).

O processo de eletrofiação requer a transferência de cargas elétricas do eletrodo para a gota de solução. Assim, a solução deve ser de natureza iônica para que o campo elétrico possa ser formado entre a agulha e o coletor, através da solução. Portanto, o mínimo de condutividade elétrica é essencial para a formação das nanofibras. A condutividade é afetada pelo polímero, tipo de solvente, concentração do polímero e temperatura (Sandri et al., 2020).

A tensão superficial é a força primária que se opõe à tensão aplicada durante a eletrofiação. Está mais relacionada à natureza do solvente do que do polímero. A alta tensão superficial inibe a eletrofiação, devido à instabilidade dos jatos e formação de gotas pulverizadas; já uma tensão superficial mais baixa leva à formação de fibras lisas e contínuas, e permite que o processo ocorra a uma baixa voltagem (Sandri et al., 2020).

A temperatura e a umidade são parâmetros ambientais inter-relacionados envolvidos na técnica de formação de fibras. O aumento da temperatura diminui a umidade e evapora o solvente mais rapidamente. A umidade elevada gera fibras de diâmetro aumentado. Estudos relataram que a umidade apropriada para fabricação de nanofibras de poliestireno foi de 25%. Portanto, um nível ideal de umidade deve ser mantido para obtenção de nanofibras com porosidade apropriada (Thenmozhi et al., 2017).

Fibras poliméricas com diâmetros que variam de alguns nanômetros até alguns microns podem ser usadas com sucesso em uma ampla variedade de aplicações. Dentre algumas aplicações podemos citar: confecção de filtros para partículas *in vivo*, nanocompósitos, fibras de reforço para nanotecnologia, suturas, filtros, modelos de roupas de proteção, membranas de células de combustível, catalizadores, baterias, entre outras (Schiffman & Schauer, 2008; Thenmozhi et al., 2017).

No campo médico e farmacêutico, as nanofibras podem ser amplamente utilizadas na fabricação de curativos para feridas, sistemas de liberação de fármacos e engenharia de tecidos (Schiffman & Schauer, 2008; Sill et al., 2011).

Os curativos ajudam a proteger a ferida de microrganismos externos, absorvendo exsudatos e acelerando o processo de cicatrização. As nanofibras podem

ser facilmente utilizadas como curativos por possuir características especiais, como a elevada área superficial, sendo assim capazes de aspirar exsudatos e regular a umidade da ferida. Além disso, a porosidade das nanofibras permite a oxigenação da ferida e promovem melhora da hemostasia da ferida (Eatemadi et al., 2014).

O objetivo dos sistemas de liberação de fármacos é entregar corretamente uma quantidade predeterminada de fármaco e com eficiência para o tecido ou célula específica e por um período definido de tempo. A taxa de dissolução do fármaco pode ser aumentada de acordo com sua área de superfície e do veículo correspondente. A baixa solubilidade e a instabilidade de agentes hidrofóbicos tornam difíceis a liberação contínua de moléculas ativas com concentração apropriada dentro de um período de tempo satisfatório. As nanofibras obtidas por eletrofiação são capazes de incorporar e acumular moléculas de fármacos por meio de duas principais abordagens: mistura de eletrofiação, que se baseia na mistura de um fármaco com uma solução polimérica antes do processo de eletrofiação ou eletrofiação coaxial, que é basicamente uma co-fiação de dois líquidos poliméricos (Eatemadi et al., 2014; Thenmozhi et al., 2017).

A eletrofiação proporciona grande flexibilidade na seleção de materiais para aplicações em sistemas de liberação de fármacos. Tanto materiais biodegradáveis, como não degradáveis, podem ser usados para controlar a liberação do fármaco que ocorre via difusão isolada ou difusão e degradação do arcabouço. Além disso, devido à flexibilidade na seleção de materiais, vários medicamentos podem ser fornecidos, incluindo: antibióticos, drogas anticâncer, proteínas e DNA (Hu et al., 2014).

Por outro lado, a semelhança morfológica das nanofibras com a MEC é o principal fator que impulsiona ao uso da eletrofiação na obtenção de arcabouços para engenharia de tecidos. Além disso, a elevada razão área superficial/volume e poros interconectados dessas malhas fibrosas garantem a desejável ligação celular, oxigênio e transporte de nutrientes. E ainda, a possibilidade de produção em grande escala e a simplicidade do processo, tornam a eletrofiação um método convincente para a fabricação dos *scaffolds* (Khorshidi et al., 2015; Vedadghavami et al., 2017).

Portanto, a eletrofiação foi a técnica adotada para confecção das nanofibras poliméricas funcionalizadas com lectinas, por ser uma técnica versátil, acessível, de baixo custo que permite a obtenção de materiais de pronta aplicação em engenharia

de tecidos. Adicionalmente, as nanofibras obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia de força atômica (AFM).

2.2.2 Aplicações de materiais eletrofiados na engenharia de tecidos

Na sessão anterior vimos algumas aplicações de materiais obtidos por eletrofiação. Porém neste trabalho daremos enfoque ao seu uso em engenharia de tecidos, a qual prioriza a fabricação materiais poliméricos biocompatíveis para substituição de tecidos e órgãos em seres humanos para uma recuperação mais rápida de determinados danos.

Os arcabouços nanofibrosos obtidos por eletrofiação têm atraído considerável interesse como plataformas potenciais em engenharia de tecidos. A eletrofiação é a mais promissora das tecnologias emergentes para a produção de múltiplos produtos biomédicos baseados em nanofibras. As nanofibras oferecem composição e morfologia controladas. Essas nanofibras podem ser usadas para fabricar estruturas de tecidos artificiais que imitam matrizes naturais (Aldana & Abraham, 2017; Uyar & Kny, 2017).

Quando o dano do tecido é grave ou perturbador, a engenharia de tecidos é considerada uma alternativa promissora, pois pode compensar a escassez do tecido do doador. Dentre as principais aplicações de produtos eletrofiados para uso em ET podemos: ossos, cartilagem, pele, nervo, entre outros. Com base nisso, muitos estudos vêm focando no desenvolvimento de matrizes poliméricas a partir da eletrofiação destinadas a tais aplicações em ET (Kumar, Naqvi & Gopinath, 2018).

Na engenharia de tecidos ósseos, os arcabouços servem como matrizes para crescimento e diferenciação de determinadas células em tecidos específicos. Além disso, tal matriz deve ter alta interconectividade poros e excelente desempenho mecânico para suportar a remodelação dinâmica do osso manipulado *in vivo* (Ao et al., 2017).

Ao et al. (2017) fabricaram arcabouços pela técnica de eletrofiação a partir de celulose de algodão natural e nano-hidroxiapatita que não demonstraram citotoxicidade e promoveram proliferação celular *in vitro*. A incorporação da estrutura

nanofibrosa à MEC demonstrou alta resistência e excelente biocompatibilidade, sendo um material interessante para aplicação na regeneração óssea. E ainda, no mesmo ano, cientistas desenvolveram arcabouços eletrofiados de uso em ET ósseo compostos por policaprolactona e óxido de magnésio para melhorar propriedades mecânicas e biológicas de tal matriz nanofibrosa (Suryavanshi et al, 2017).

Por outro lado, imitar a cartilagem requer o design e a fabricação de arcabouços anisotrópicos capaz de simular a bioquímica hierárquica, biofísica e geométrica dependente da profundidade do arranjo do tecido cartilaginoso. Com esse intuito, muitos hidrogéis e arcabouços porosos foram desenvolvidos, mas não ofereceram pistas topográficas biomimétricas em nanoescala análogas à MEC cartilaginosa. Em contrapartida, a construção de arcabouços a partir da eletrofiação é capaz de produzir malhas fibrosas com facilidade, baixo custo, composição química controlável, orientação e tamanho (Girão et al., 2018). Por exemplo, Girão et al. (2018) desenvolveram arcabouços eletrofiados anisotrópicos funcionais com geometrias fibrosas personalizadas que demonstraram bons resultados em protocolos de cultura de células e na engenharia de tecidos cartilaginosos.

No âmbito da pele, a ET requer o desenvolvimento de arcabouços biomiméticos que fornecem toda a bioquímica e topografia necessária para uma regeneração eficiente da pele. As propriedades mecânicas de locais específicos são baseadas nos atributos anatômicos do corpo humano, logo isso deve ser levado em consideração na construção dos arcabouços (Keirouz et al.,2019).

Um dos principais fatores que influenciam o sucesso de um exerto de pele é o tipo de arcabouço utilizado. Diferentes técnicas já foram relatadas para o desenvolvimento de um arcabouço funcional para tecido cutâneo e a eletrofiação foi considerada como uma técnica ideal para a síntese tais arcabouços. Recentemente, Jiménez Vázquez & San Martín Martínez. (2019) extraíram o colágeno da pele de galinha e combinaram com elastina para a síntese de um arcabouço reticulado por eletrofiação. O estudo foi realizado avaliando-se a adesão e proliferação celular de queratinócitos e fibroblastos dentro da matriz, evidenciando uma fonte alternativa de colágeno e possível aplicação clínica.

Adicionalmente, uma ampla pesquisa sobre diferentes tipos de arcabouços para a pele em engenharia de tecidos tem sido relatada nas últimas décadas, estando muitos já disponíveis no mercado para o tratamento de feridas profundas na pele. Alguns arcabouços fibrosos disponíveis no mercado incluem: Terudermis® e Pelanac® (possuem colágeno), Biobrane® e Integra® (arcabouços acelulares), Apligraf® e Transcyte® (arcabouços celulares) (Chaudhari et al., 2016).

A engenharia de tecidos em relação a nervos periféricos é uma tecnologia emergente para projetar biomateriais avançados para regeneração de nervos lesionados (Zha et al., 2019). A regeneração do tecido nervoso requer o reparo ou substituição de células nervosas danificadas por lesão ou doença. No entanto, o sistema nervoso central tem capacidade limitada para regenerar células nervosas danificadas. Logo, a terapia celular é uma via promissora para tratar distúrbios neurológicos, pois células-tronco podem se diferenciar em vários tipos de células, incluindo neurônios, servindo como fonte para a substituição celular de células danificadas (Li & Tjong, 2019).

Arcabouços adequados para ET neurais devem ser capazes de reduzir os requisitos de nervos autólogos e guiar fisicamente os axônios germinativos da extremidade proximal do nervo (Zha et al., 2019). Por exemplo, Guo et al. (2018) desenvolveram nanofibras de PVA com revestimento de queratose (queratina oxidativa-KOS) por meio da eletrospinação as quais foram utilizadas para cultura de células neurais. A mistura de PVA e queratose forneceram propriedades mecânicas mais fortes e melhor molhabilidade, além de facilitar significativamente, a morfologia, adesão e proliferação de células neurais, demonstrando grande potencial de aplicação para a engenharia de tecidos neurais.

2.3 Nanotecnologia e Biossensores

2.3.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia (NT) refere-se a qualquer tecnologia que é implementada em nanoescala. É definida como o controle ou reestruturação da matéria nos níveis atômicos e moleculares com dimensões de 1 a 100 nm (Hulla et al., 2015; Bhushan, 2017). A NT abrange a nanomanufatura, nanomateriais e aplicação de sistemas

físicos, químicos e biológicos em escalas que variam de átomos ou moléculas individuais a dimensões submicrônicas, bem como, a integração das nanoestruturas resultando em sistemas maiores (Bhushan, 2017). Trata-se de uma disciplina integrativa, que representa a combinação de matemática, ciências da computação e materiais com o objetivo de investigar e manipular a matéria física na escala dos nanômetros (Barkalina et al., 2014).

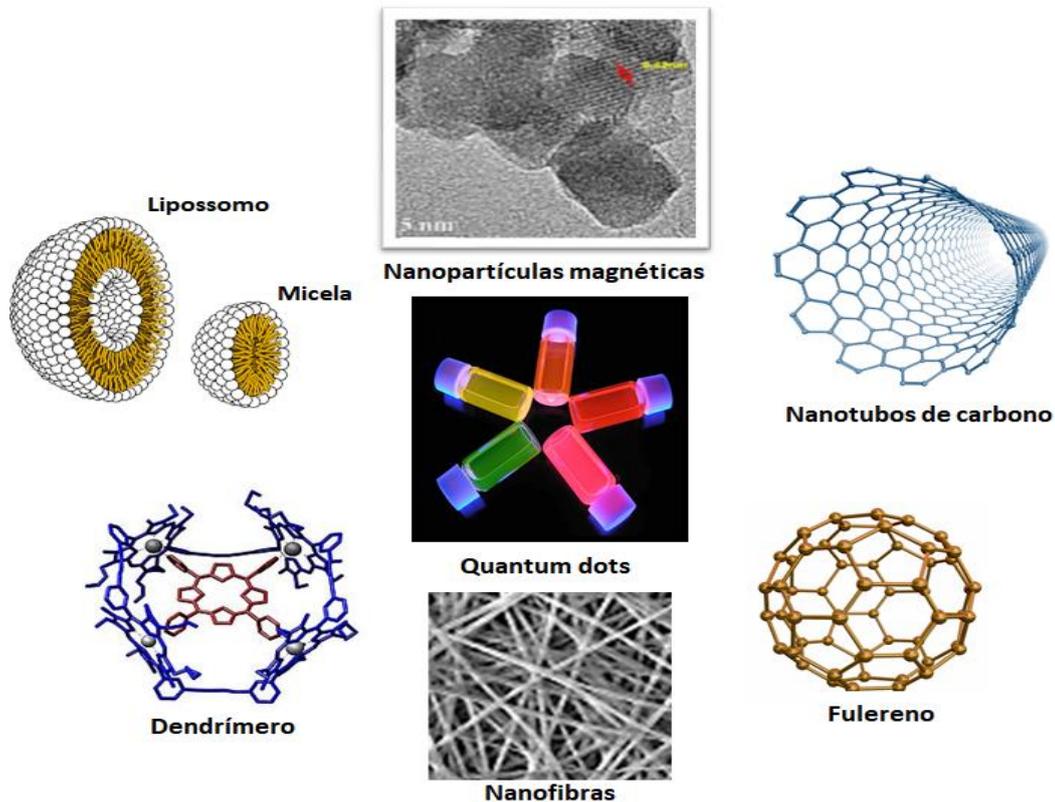
O interesse geral nessa área se dá principalmente pelo fato de que as propriedades de objetos e materiais em nanoescala são bastante diferentes em suas propriedades em relação aos mesmos materiais criados em maiores dimensões. A diminuição do tamanho do material a nanoescala, aumenta drasticamente a área de superfície, rugosidade e relação área/volume de superfície, levando a criação de um material com propriedades físico-químicas superiores (mecânicas, ópticas, catalíticas, magnéticas, etc) (He, Liu & Lin, 2015). Além dos vários usos industriais, a nanotecnologia vem trazendo grandes inovações com aplicações significativas na área da farmácia, cosmética, biotecnologia, alimentos processados, engenharia química, eletrônica, mecânica, ciências ambientais, entre outras (Logothetidis, 2012; Robles-García et al., 2016; Presad, 2017).

Dentre as aplicações importantes da nanotecnologia está o seu uso no setor farmacêutico, incluindo o desenvolvimento de novas abordagens de controle de liberação e direcionamento de drogas, assim como, melhorias na biodisponibilidade de medicamentos. Como exemplo, podemos citar nanopartículas para entrega de moléculas (drogas, fatores de crescimento, DNA), visando o aprimoramento da carga terapêutica no alvo patológico, assim como, da proteção de drogas lábeis e penetração nas barreiras fisiológicas. Vários tipos de nanofarmacêuticos são usados com o objetivo de melhorar a chegada de fármacos nas células e tecidos cancerígenos. Alguns exemplos são as nanoemulsões, nanossuspensões, nanoesferas, nanotubos, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas, dendrímeros, nanofluidos, etc (Engel et al., 2008; Gao, Zhang & Sun, 2012; Robles-García et al., 2016).

Adicionalmente, podemos citar ainda a modificação de superfície de superfícies de materiais implantáveis; nanodispositivos, como os biossensores e as nanofibras, os quais fazem parte das principais aplicações deste trabalho.

A NT vem alcançando um grande progresso nas últimas décadas com o uso dos nanomateriais (NM). Os NM são substâncias com pelo menos uma de suas dimensões dentro da escala nanométrica. Então, eles podem se referir como 1D, 2D e 3D, com uma, duas e todas as suas dimensões dentro escala nanométrica respectivamente. Podemos visualizar alguns exemplos de nanomateriais na figura 11 (Razzaq et al., 2020).

Fig.11 Exemplos de Nanomateriais. Fonte: autor próprio.



Os NMs podem ser classificados em quatro categorias, descritas abaixo (Khan, 2020):

- **Nanomateriais de carbono:** São NMs que contêm carbono e podem ser sintetizados em diferentes formas, como tubos ou esferas. Nanofibras de

carbono, grafeno, fulerenos e nanotubos de carbono são classificados como nanomateriais de carbono;

- Nanomateriais de metal e óxido de metal: O metal e o óxido de metal também podem ser usados para produzir NMs, chamados de nanomateriais metálicos, nanomateriais de óxidos metálicos ou nanomateriais inorgânicos. São os NMs de ouro (Au), Prata (Ag) e nanomateriais baseados em óxidos metálicos, como o dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO).
- Nanomateriais orgânicos: Este tipo de NM contém principalmente matéria orgânica, sem carbono ou com base inorgânica. Uma das características desses nanomateriais orgânicos é que eles possuem ligações não covalentes (de natureza fraca, que podem ser facilmente quebradas). Estes NMs materiais orgânicos podem ser facilmente modificados para produzir diferentes formas de nanomateriais, como: lipossomas, dendrímeros, micelas e polímeros.
- Nanocompósitos: A combinação de um tipo de nanomateriais com outro tipo de nanomateriais é chamada de nanocompósito. Os nanocompósitos podem ser qualquer combinação de nanofios, nanofibras à base de metal, à base de carbono ou orgânicos, com qualquer forma de cerâmica, metal ou polímero.

As duas principais fontes através das quais os NMs são produzidos correspondem às fontes sintéticas e nanopartículas de ocorrência natural (Khan, 2020).

As nanopartículas (NPs) pertencem a uma ampla classe de materiais que incluem substâncias particuladas com dimensão inferior a 100 nm, pelo menos. As NPs são compostas por três camadas: (a) camada superficial, que pode ser funcionalizada com uma variedade de pequenas moléculas, íons metálicos, surfactantes e polímeros; (b) camada de casca, que é material quimicamente diferente do núcleo em todos os aspectos; e (c) o núcleo, que é essencialmente a parte central da NP (Khan, Saeed & Khan, 2017).

As nanopartículas podem ser sintetizadas a partir de muitos materiais por vários métodos físicos e químicos, com as partículas diferindo em sua composição elementar, forma, tamanho e propriedades químicas ou físicas. Os métodos de síntese das NPs pode ser divididos em duas classes principais: (1) Síntese “*Top-*

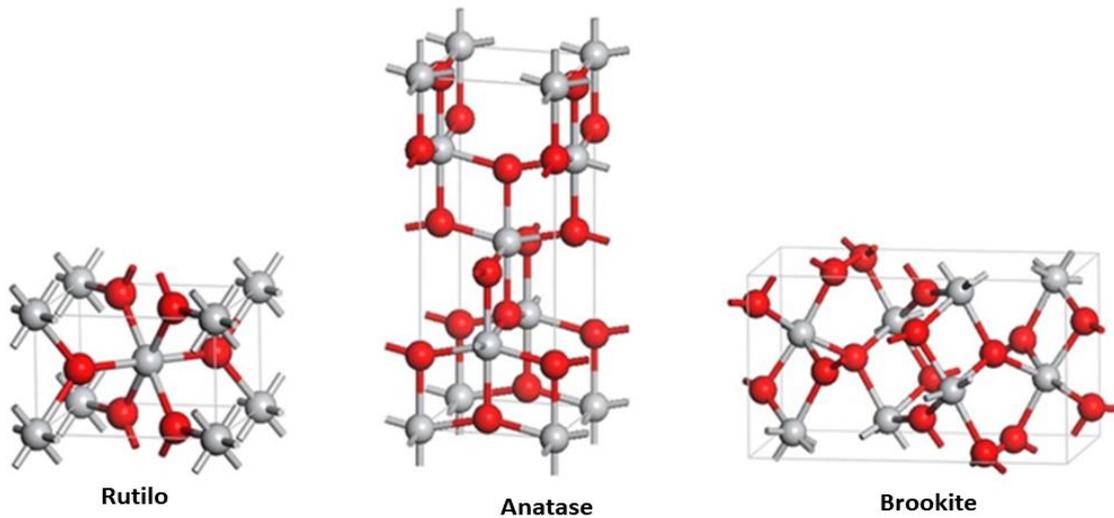
down” (de cima para baixo), na qual é empregada uma abordagem destrutiva, iniciando da molécula maior, que se decompõe em unidades menores, e por fim, essas unidades são convertidas em NPs adequadas. Exemplos deste método são a moagem, deposição de vapor químico, deposição de vapor físico, entre outras; (2) Síntese “*Bottom-up*” (de baixo para cima), é a auto-montagem de átomos e moléculas em partículas maiores (Kango et al., 2013; Khan, Saeed & Khan, 2017; Sullivan et al., 2018).

Em dimensões nanométricas, as propriedades do material podem mudar significativamente para diferir completamente de seus homólogos em massa. À medida que o tamanho do material diminui, a proporção dos átomos de superfície aumenta, o que aumenta a reatividade e os torna catalisadores altamente ativos. Portanto, as nanopartículas possuem propriedades eletrônicas, ópticas, magnéticas e mecânicas que surgem explicitamente devido ao seu tamanho em escala nanométrica (Kango et al., 2013).

Nps são usadas para diversos fins, desde tratamentos médicos, utilização na indústria de produção de baterias solares, de combustíveis, até a ampla incorporação em diversos produtos, como cosméticos e roupas. Uma das mais relevantes aplicações das nanopartículas na área médica está relacionada com sistemas de liberação de fármacos, assim como, com o diagnóstico de doenças. As nanopartículas também podem contribuir para o desenvolvimento de superfícies e sistemas “inteligentes”, com características importantes, como resistência, leveza e em alguns casos ação antimicrobiana. E ainda, Nps são usadas na construção de biossensores, diminuindo os limites de detecção para várias biomoléculas, fornecendo alta sensibilidade e alta seletividade ao sistema (Hasan, 2014; Prickril & Rasooly, 2017).

As Nps de TiO_2 são amplamente utilizadas em produtos utilizados no cotidiano e em aplicações industriais, devido a sua alta estabilidade, alta eficiência fotocatalítica, propriedades anticorrosivas e baixo custo. Foi demonstrado que suas propriedades dependem do tamanho, morfologia e fase cristalina das NPsTiO_2 . O TiO_2 ocorre em três formas cristalinas polimórficas: brookita, rutilo e anatase (Figura 12) (Shi et al., 2013; Li et al., 2019; Haider, Jameel, & Al-Hussaini, 2019).

Fig.12 Representações cristalográficas do dióxido de titânio (TiO_2). *Fonte: (<https://www.researchgate.net/figure/Figura-4-Estruturas-Cristalograficas-do-dioxido-de-titanio-a-rutilo-b-anatase>)/2019.



Os nanomateriais de dióxido de titânio (TiO_2) são conhecidos por possuírem numerosas e variadas aplicações que vão desde a obtenção de células fotovoltaicas, protetores solares e pasta de dente; purificação do ar, purificação da água, descontaminação, antibacteriano, sensoriamento, etc. (Chen & Selloni, 2014; Shi et al., 2013; Haider et al., 2019).

As NPsTiO_2 têm muitas propriedades únicas, como biocompatibilidade, estabilidade química, propriedades ópticas, elevada área de superfície e baixa toxicidade. É por causa dessas propriedades que houve o aumento do uso de tais nanopartículas em aplicações biomédicas, como na administração de medicamentos, bioimagem, terapia de fotoablação contra células cancerígenas e biossensores (Fei et al., 2013; McNamara & Tofail, 2016; Shetti et al., 2016; Haider et al., 2019).

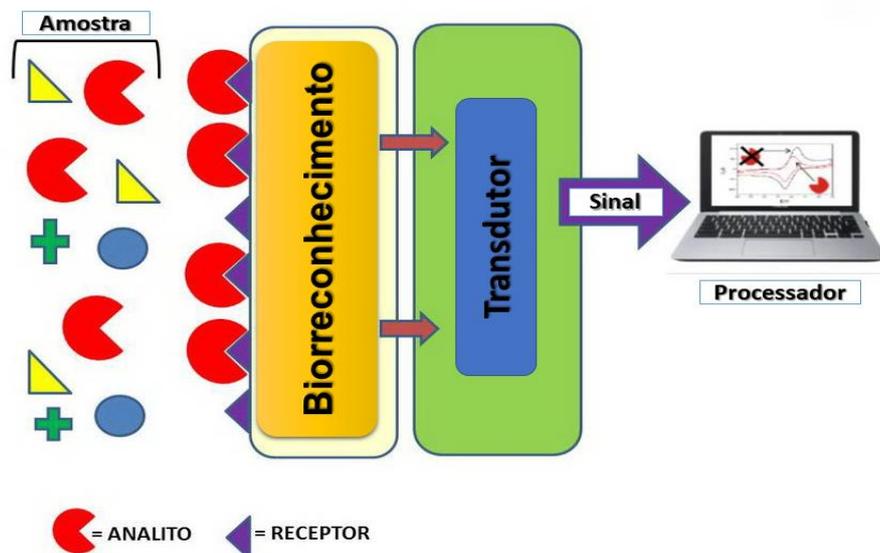
Devido à sua boa biocompatibilidade e alta condutividade, o TiO_2 tem sido amplamente utilizado na fabricação de biossensores eletroquímicos. Em muitos destes biossensores, o TiO_2 foi empregado como matriz de suporte para enzimas imobilizadoras. Os resultados mostraram que os compósitos à base de TiO_2 foram capazes de facilitar a transferência direta de elétrons e aumentar a atividade catalítica das enzimas (Huang et al., 2013; Wang et al., 2015). No presente estudo o TiO_2 foi

utilizado como matriz de suporte para um peptídeo antimicrobiano no reconhecimento de fungos do gênero *Candida*.

2.3.2 Biossensores

Um biossensor é um dispositivo analítico que funciona para analisar uma amostra na presença de um determinado analito alvo. Normalmente, um biossensor é constituído a partir de: (1) um componente biológico, bioelemento ou biorreceptor, onde ocorre o biorreconhecimento; (2) transdutor, que pode ser eletroquímico, óptico, eletrônico, piezoelétrico, piroelétrico ou gravimétrico e (3) a unidade eletrônica, que contém o amplificador, processador e tela (Figura 13) (McNamara & Tofail, 2017; Nguyen et al., 2019).

Fig.13 Esquema dos componentes de um biossensor. *Fonte: (https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Biossensores-Esquema-de-los-componentes-de-un-biossensor_fig1_325428576)/2020.



Os biossensores são utilizados em diversas áreas, inclusive ambientais, indústrias farmacêuticas, alimentar e médica (McNamara & Tofail, 2017). Possuem várias vantagens potenciais sobre outros métodos de biodeteção, incluindo maior velocidade e flexibilidade de ensaio. A análise rápida em tempo real pode fornecer informações interativas imediatas aos profissionais de saúde que podem ser

incorporadas ao planejamento de cuidados com o paciente. Além disso, os biossensores permitem análises multi-alvo, automação e redução de custos. O diagnóstico baseado em biossensores também pode facilitar a triagem do câncer e outras doenças, melhorando a detecção precoce e, portanto, melhorando o prognóstico (Prickril & Rasooly, 2017).

Os elementos de reconhecimento em um biossensor são imobilizados na superfície dos transdutores e interagem com moléculas alvo sem adicionar reagentes à solução da amostra. Em operação, as interações específicas entre o analito alvo e os elementos de reconhecimento produzem alterações físico-químicas na superfície do transdutor. As alterações são então reconhecidas pelo transdutor e convertidas em sinais mensuráveis que então podem ser usados para determinar a quantidade de analito presente na amostra (Nguyen et al., 2019).

Geralmente, os biossensores são classificados com base no componente biológico utilizado, como enzimas, anticorpos, peptídeos, ácidos nucleicos ou células, ou pelo tipo de transdutor. Outra forma de classificar os biossensores é pelo modo de interação entre os analitos e o componente biológico em um biossensor. São dois tipos: biossensor catalítico, no qual as interações resultam na formação de um novo produto de reação química e biossensor de afinidade, no qual as interações resultam na ligação do analito à superfície do transdutor (Nguyen et al., 2019).

O transdutor usado no biossensor depende da reação gerada entre a amostra e o biorreceptor. Biossensores eletroquímicos (BE), como sensores amperométricos, detectam alterações na corrente devido a reações de oxidação/redução. Sensores potenciométricos podem detectar mudanças na distribuição de cargas. Os biossensores ópticos podem ser calorimétricos que detectam alterações na absorção de luz ou fotométricos, que detectam alterações de fótons. Já os sensores piezoelétricos podem detectar alterações de massa (McNamara & Tofail, 2017).

Entre as diferentes classificações, os biossensores eletroquímicos (BEs) são promissores devido ao baixo custo de produção, alta sensibilidade e facilidade de operação. Combina o poder analítico da técnica eletroquímica com a especificidade do biorreceptor. O mecanismo de detecção é baseado no fato de que durante o evento de interação elemento-analito de reconhecimento, espécies eletroativas, como

elétrons, são consumidas ou produzidas, gerando um sinal eletroquímico que é detectado pelo transdutor eletroquímico (Sandhyarani, 2019).

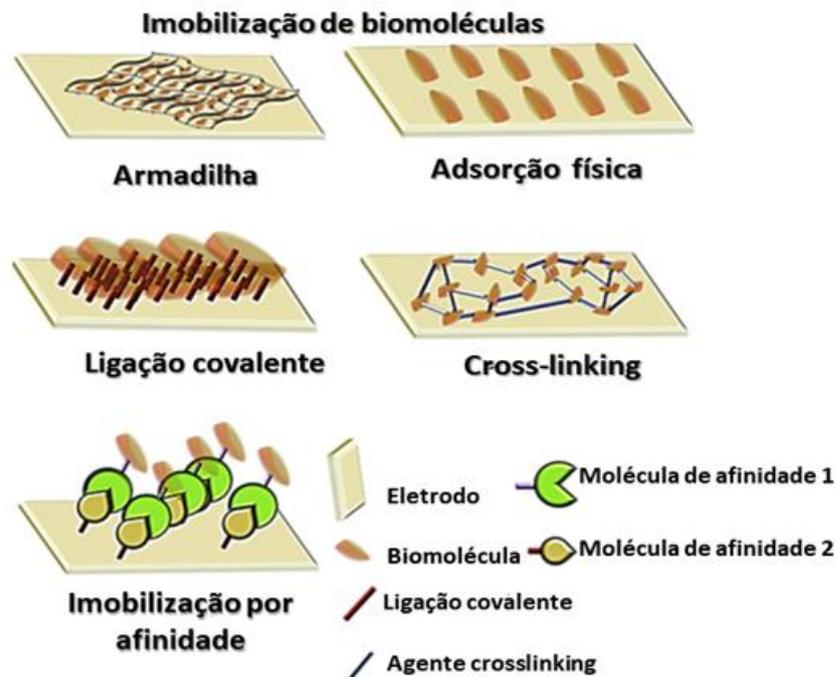
Os BEs são a classe de biossensores mais propensos à miniaturização e a mais usada. Nos biossensores eletroquímicos, as informações qualitativas e quantitativas do analito são obtidas na forma de voltagem ou corrente, sendo assim conhecidos como, biossensor potenciométrico ou biossensor amperométrico, respectivamente (Sandhyarani, 2019).

Os materiais utilizados nos sensores eletroquímicos são classificados em: (1) materiais para o eletrodo e substrato de suporte (metais: platina, ouro, prata, aço inoxidável; materiais à base de carbono: grafite e fibra de carbono; polímeros ou sais orgânicos eletrocondutores; (2) materiais para maior sensibilidade e seletividade (especialmente materiais de tamanho nanométrico: nanopartículas e nanotubos de carbono; (3) materiais para a imobilização de elementos de reconhecimento biológico (agentes multifuncionais: glutaraldeído e diisocianato de hexametil ou polímeros alternativos: poliacrilamida e polifenol) e (4) elementos biológicos (enzimas, anticorpos, antígenos, mediadores e cofatores) (Moretto & Kalcher, 2014).

Uma das etapas mais importantes na construção dos BEs é a imobilização ideal do biocomponente na superfície do eletrodo. Essa imobilização ideal deve garantir uma quantidade máxima de biorreceptor imobilizado ou, mais apropriadamente, um número máximo de sítios reativos imobilizados em uma unidade de substrato, bem como sua estabilidade e eficácia. Dentre as várias superfícies utilizadas para imobilização das biomoléculas estão: silício, vidro, ouro, nanotubo de carbono, polímeros, grafeno, etc (Moretto & Kalcher, 2014).

As técnicas de imobilização são classificadas em duas categorias: métodos reversíveis e irreversíveis. Métodos reversíveis incluem a adsorção (física e química) e métodos irreversíveis incluem armadilha (oclusão), acoplamento covalente, reticulação (cross-linking) e imobilização por afinidade (Figura 14).

Fig. 14 Ilustração esquemática dos métodos de imobilização comumente usados para biomoléculas nas superfícies dos eletrodos. *Fonte: Adaptado de Sandhyarani (2019).



A adsorção física é o método mais simples de imobilização, no qual as biomoléculas são ligadas à superfície por meio de ligações fracas, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Já adsorção química envolve a ligação covalente direta entre as biomoléculas e a superfície do eletrodo através de grupos funcionais das moléculas presentes na superfície. O método mais utilizado para a adsorção química de biomoléculas é usar monocamadas auto-montadas com os grupos funcionais terminais, como amina ou ácido carboxílico, que são normalmente ativados usando o éster N-hidroxissuccinimida (NHS). O método de armadilha é centrado na oclusão de uma biomolécula dentro de uma matriz sol-gel ou uma rede polimérica. Baseia-se no crescimento da rede de gel ou das cadeias poliméricas em torno da biomolécula, assim, as biomoléculas aprisionadas permanecem disponíveis para o biorreconhecimento. A imobilização por reticulação ou “*cross-linking*” é o método de união química das moléculas por uma ligação covalente através de reticuladores que contêm extremidades reativas que reagem a grupos funcionais específicos nas biomoléculas. Nesse caso as ligações covalentes

se formam entre a biomolécula e a superfície sólida/eletrodo através dos reticuladores. Finalmente, na imobilização por afinidade, o princípio de afinidade entre biomoléculas complementares é utilizado, sendo a principal vantagem do método a seletividade significativa da interação. Trata-se de uma interação não covalente (Figura 14) (Sandhyarani, 2019).

Dado o mecanismo funcional dos BEs, é apropriado a modificação da superfície do eletrodo, sendo crucial para o seu desempenho. As modificações superficiais não apenas ajudam na imobilização adequada dos biorreceptores, como também desempenham um papel central no controle de ruído e maior sensibilidade. E ainda, a funcionalização da superfície ajuda a diminuir a ligação não específica indesejada do analito ou outros componentes na superfície do eletrodo (Moretto & Kalcher, 2014; Sandhyarani, 2019).

Os principais métodos usados na funcionalização da superfície de um eletrodo podem ser a formação de monocamadas automontadas, eletrodeposição de polímeros e o uso de polímeros condutores (eletropolimerização):

- Monocamadas automontadas (SAMs - *do inglês Self-Assembled monolayers*): São conjuntos ordenados de moléculas formadas na superfície sólida por forte adsorção química do grupo principal da molécula. Exemplos: SAMs de carboxilado nas superfícies de óxido, SAMs de silano nas superfícies de vidro/silício e SAMs de alceno tiol em metais nobres;
- Eletrodeposição: Promove a formação de filmes ou partículas na superfície do eletrodo. A mudança no potencial eletroquímico de um eletrodo pela aplicação de um campo elétrico externo leva a reação de redução ou oxidação na superfície do eletrodo. Essas reações podem levar a uma deposição ou dissolução na superfície do eletrodo, dependendo da mudança de potencial. Ocorre em duas etapas: (1) difusão de espécies carregadas da solução para o eletrodo e (2) redução de espécies carregadas na superfície do eletrodo e crescimento de partículas ou filme na superfície. A reação continua até que um novo estado de equilíbrio seja alcançado;
- Polímeros condutores: fornecem uma plataforma adequada para imobilização de biorreceptores e rápida transferência de elétrons através deles. Revestimentos

poliméricos podem ser utilizados para a modificação de uma grande variedade de eletrodos usados em biossensores eletroquímicos, sendo realizados por eletropolimerização ou fundição em solução de polímeros pré-formados (Sandhyarani, 2019).

Eletrodos modificados com polímeros podem ser preparados por deposição direta de polímeros na superfície (por métodos de revestimento por gota, imersão ou centrifugação) ou por polimerização na superfície do eletrodo (por meio de rotas químicas, eletroquímicas ou fotoquímicas). Os primeiros são usados quando os polímeros já estão sintetizados e precisam ser imobilizados como estão. No último caso, o eletrodo é imerso em uma solução de monômero e um potencial adequado é aplicado para permitir a formação do filme de polímero na superfície do eletrodo. Isso é alcançado através da polarização geralmente cíclica da superfície do eletrodo que é ao mesmo tempo exposta a uma solução do monômero. O exemplo mais conhecido é provavelmente a poli (anilina), mas também o poli (pirrol) ou o poli (tiofeno) são populares. O resultado da eletropolimerização é geralmente um condutor eletricamente fino que pode ser explorado por seus grupos funcionais, como armadilha para as biomoléculas ou como ancoragem para outros modificadores de eletrodo (Moretto & Kalcher, 2014).

No presente trabalho foi realizado eletropolimerização, através da técnica eletroquímica de Voltametria cíclica, do ácido tiofeno-3- acético (3TAA), onde através de um potencial aplicado houve a formação de um filme de poli (ácido tiofeno-3- acético) (PTAA) na superfície do eletrodo.

2.3.2.1 Biossensores baseados em peptídeos antimicrobianos

Peptídeos compartilham a mesma estrutura química das proteínas, logo, são candidatos ideais para substituir proteínas como receptores em biossensores. Com base nisso, os peptídeos vêm atraindo atenção significativa como elementos biodetectores alternativos para o desenvolvimento estável, sensível de dispositivos de detecção seletiva. Em contraste com anticorpos e sondas de ácidos nucleicos, os peptídeos são naturalmente mais estáveis, mais fáceis de produzir ou sintetizar e são mais baratos (Etayash et al., 2017).

Mesmo com poucas pesquisas dedicadas ao estudo das interações entre peptídeos antimicrobianos imobilizados em biossensores e a superfície de bactérias e fungos, o que faz com que os mecanismos de reconhecimento não sejam tão claros, os PAMs atraíram muitas atenções no campo da biossensibilidade devido à sua alta afinidade com tais microrganismos. O baixo peso molecular os torna mais estáveis e flexíveis do que os anticorpos, na fabricação, utilização e armazenamento dos biossensores. De fato, alguns PAMs mantêm a afinidade com bactérias e fungos sob condições ambientais adversas (desnaturantes químicos ou alta temperatura), o que melhoram significativamente a estabilidade e reprodutibilidade dos biossensores. Portanto, a alta afinidade dos PAMs com tais microrganismos faz com que os biossensores funcionem mesmo em baixas concentrações destes (Qiao et al., 2020).

Etayash et al. (2017) desenvolveram uma plataforma biossensora para detecção de bactérias baseada em um peptídeo antimicrobiano da classe das bacteriocinas, a Leucocina A. Na construção do biossensor foi utilizada a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica e o mesmo foi capaz de reconhecer *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *L. innocua* e *E. Faecalis*. Mais tarde, pesquisadores utilizaram o peptídeo antimicrobiano Melittina no desenvolvimento de um biossensor para detecção de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Salmonella typhimurium* (*S. typhi*) em água potável e suco de maçã. A melitina é uma molécula anfipática catiônica que compreende 26 aminoácidos e já havia sido usada no biorreconhecimento das espécies patogênicas *Coxiella burnetti* e *Brucella melitensis* (Wilson et al., 2018).

O nosso grupo também vem realizando o desenvolvimento de biossensores baseados em peptídeos antimicrobianos. Andrade et al. (2015) desenvolveram um biossensor seletivo e sensível para monitorar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas baseado em nanotubos de carbono, funcionalizados com grupos -COOH, e o peptídeo Clavanina A. A técnica utilizada para caracterização foi a de EIE e foi obtido o limite de detecção de 10^2 UFC mL⁻¹ e 10^6 UFC mL⁻¹ para *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente; e para *E. faecalis* e *B. subtilis*, o limite de detecção foi de 10^3 UFC mL⁻¹. Em outro estudo, De Miranda et al. (2017) demonstrou um biossensor nanoestruturado baseado em NPs_{Au} e monocamadas auto-montadas de cisteína.

Foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e EIE. A resposta eletroquímica foi avaliada frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*. Adicionalmente, Junior et al. (2018) desenvolveram um biossensor eletroquímico baseado no peptídeo natural Clavanina A para detecção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mostrando uma melhor detecção para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. typhimurium*, com um limite de detecção de 10^1 UFC mL⁻¹, que corresponde a ~ 0,01 µL⁻¹ de bactéria.

Podemos considerar como raro na literatura biossensores baseados em PAMs específicos para fungos, uma vez que o seu mecanismo de ação frente a esses microrganismos ainda não foi totalmente elucidado. Porém, alguns biossensores desenvolvidos demonstraram bom desempenho na detecção de certas espécies de fungos. Shi et al. (2017) desenvolveram um biossensor piezoelétrico de detecção rápida e sensível, baseado em pleurocidina, um peptídeo antimicrobiano de 25 resíduos de aminoácidos. O biossensor construído mostrou boa resposta a amostras de sangue simuladas contendo bactérias gram-positivas, gram-negativas e o fungo *Candida albicans*, para o qual o limite de detecção foi de 10^2 UFC mL⁻¹.

Neste trabalho desenvolvemos um biossensor eletroquímico para detecção de fungos do gênero *Candida*, a partir do qual conseguimos diferenciar 4 espécies de potencial patogênico. E para isso utilizamos técnicas de caracterização como: espectroscopia de impedância eletroquímica, Voltametria cíclica e microscopia de força atômica.

2.4 Técnicas de caracterização

2.4.1. Espectroscopia de Impedância eletroquímica

Impedância é a capacidade de um circuito resistir ao fluxo da corrente elétrica, e a técnica em que a impedância é plotada versus a frequência é chamada espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A base da espectroscopia de impedância foi realizada por Oliver Heaviside, no final do século, XIX. Nos primeiros anos de desenvolvimento, a EIE era empregada, principalmente, para medir a

capacitância de eletrodos idealmente polarizáveis que resultaram no desenvolvimento de vários modelos para interfaces elétricas (Brock, 2017).

EIE é uma técnica antiga que tem sido continuamente desenvolvida e utilizada para estudar vários processos, tais como: reações redox em eletrodos, adsorção, cinéticas das reações, transferências de massa, determinação da resistência da solução, aplicações em fontes de energia, corrosão, reações eletrocatalíticas (ex: eletrólise da água), polímeros condutores, monocamadas automontadas, biomembranas, sensores, e outros (Lasia, 2014; Brock, 2017).

O conceito de impedância foi derivado da resistência, que é definido pela lei de Ohm como a razão entre a tensão (E) e a corrente (I). A lei de Ohm é um conceito simples de resistência que exclui a frequência e o tempo dependente da mudança de fase entre a corrente sinusoidal e a da voltagem. Quando expressa em função do tempo (t), o potencial da excitação sinusoidal é expresso como $(E_t) = E_0 \text{Sen}(\omega t)$ e a resposta da corrente como $(I_t) = I_0 \text{Sen}(\omega t + \phi)$, onde E_0 e I_0 são as amplitudes de potencial e corrente, respectivamente. ω é a frequência radial em radianos/segundo ($= 2\pi f$, onde f é a frequência em hertz), e ϕ é a diferença do ângulo de fase entre corrente e o potencial.

Então a impedância (Z) pode ser expressa como:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \text{sen}(\omega t)}{I_0 \text{sen}(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\text{sen}(\omega t)}{\text{sen}(\omega t + \phi)}$$

Eq.1.

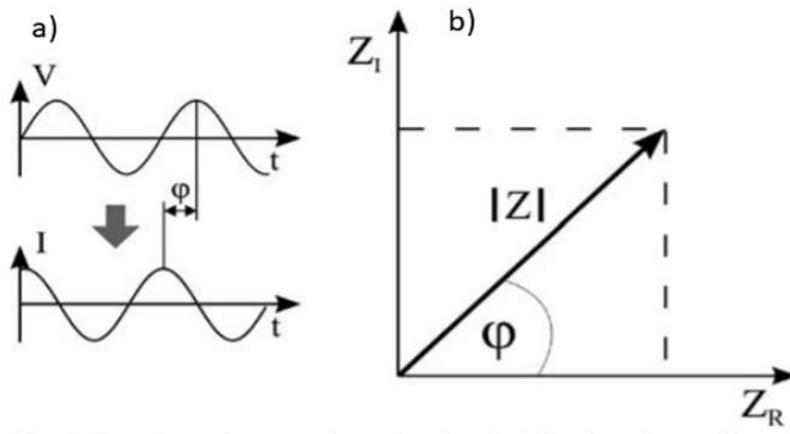
Usando a fórmula de Euler, a impedância pode ser expressa com a função seguinte, a fim de expressar a dependência do ângulo de fase por meio de funções trigonométricas:

$$Z(\omega) = |Z|e^{j\phi} = Z_0 (\cos\phi + j\text{sen}\phi) = Z' + jZ'' \quad \text{Eq.2.}$$

Onde $j = (-1)^{1/2}$ e Z' e Z'' são impedância real e imaginária, respectivamente (Brock, 2017).

A impedância é um valor complexo, pois a corrente pode diferir não apenas em termos de amplitude, mas também pode mostrar uma mudança de fase φ em comparação com a função tensão-tempo. Assim, o valor pode ser descrito pelo módulo $|Z|$ e a mudança de fase por φ ou, alternativamente, pela real Z_R e pela parte imaginária da impedância Z_I (Figura 15). Portanto, os resultados de uma medição de impedância podem ser ilustrados de duas maneiras diferentes: usando um gráfico Bode, que plota $\log|Z|$ em função do $\log f$ ou usando um gráfico de Nyquist que traça Z_R e Z_I para obter um semicírculo em alta frequência e um componente linear em baixa frequência (Figura 16) (Lisdat & Schäfer, 2008; Brock, 2017).

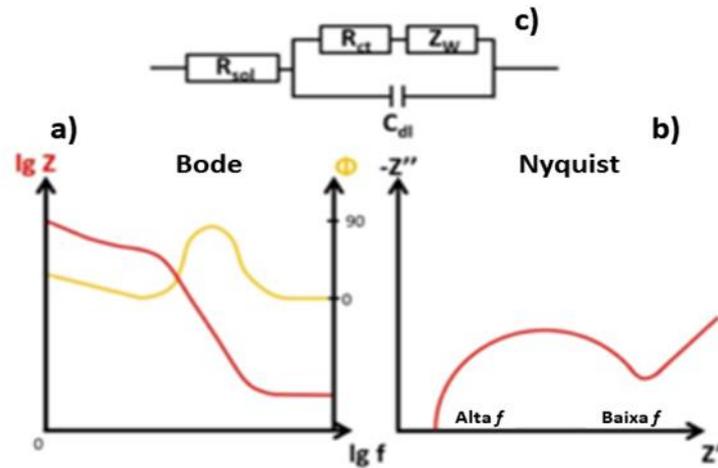
Fig. 15 Ilustração de como a impedância pode ser representada: a) quociente das funções tensão (V) e corrente (I) e b) módulo de Z e o ângulo de fase φ , ou partes reais (Z_R) e imaginárias (Z_I) da impedância. *Fonte: Lisdat & Schäfer (2008).



O componente semicírculo em um gráfico de Nyquist representa o processo limitador de transferência de carga ou elétrons na superfície do eletrodo, cujo valor é calculado medindo-se o diâmetro do semicírculo. O aumento do diâmetro do semicírculo significa o aumento da resistência à transferência de carga (R_{ct}) e vice-versa (Figura 16-a e 16-b). O componente linear do gráfico de Nyquist representa um processo limitado de difusão. O gráfico de Nyquist pode dar informações de diferentes tipos de circuitos equivalentes. O circuito de Randles (Figura 16-c), é o circuito equivalente mais utilizado em experimentos de biossensores e consiste em: resistência

da solução (R_s), resistência à transferência de cargas (R_{ct}), impedância de Warburg (Z_w) e um elemento de fase constante ou capacitor não ideal (Q) (Brock, 2017).

Fig. 16 a) gráfico de bode, b) gráfico de nyquist e c) circuito de Randles. *Fonte: (https://www.palmsenscorrosion.com/knowledgebase_tags/bode-plot/)/2020.



A cinética da reação redox da sonda na superfície do eletrodo pode ser representada por R_{ct} e Q . No entanto, Q é facilmente afetado pela superfície rugosa e não homogênea do eletrodo, logo o R_{ct} é comumente usado para biossensores. O Z_w o fenômeno de difusão, e R_s são as propriedades da solução eletrolítica (Brock, 2017).

Como a EIE é capaz de sondar a natureza do eletrodo aplicando um pequeno potencial sinusoidal (2-10mV) em função da frequência, tornou-se o ideal candidato para estudar interações biomoleculares, incluindo carboidrato-proteína, proteína-proteína e proteína-DNA. Isso também levou ao seu uso na detecção de biomarcadores de doenças e microrganismos, como uma técnica para biossensor (Lasia, 2014).

Portanto, neste trabalho utilizamos a técnica de EIE tanto para avaliar a resposta dielétrica de membranas poliméricas obtidas por eletrofiação frente à CTMs, como fizemos uso de tal técnica na construção de um biossensor eletroquímico para detecção de *Candida spp.*

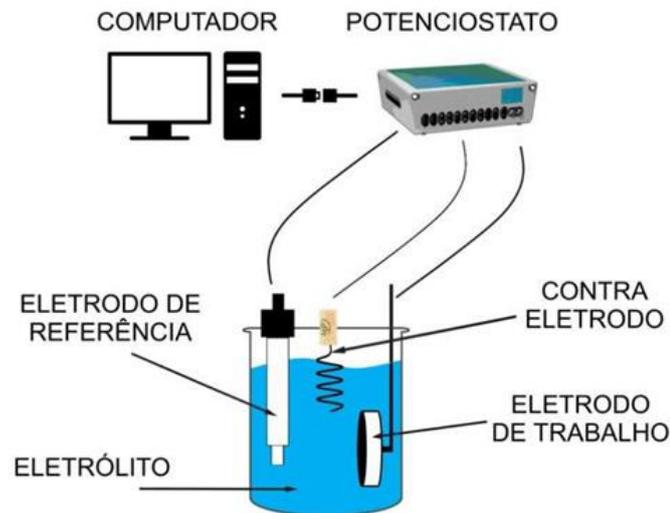
2.4.2. Voltametria Cíclica

A Voltametria é uma categoria de métodos eletroanalíticos utilizados na análise de vários analitos. Na Voltametria, as informações sobre um analito são obtidas pela medição de fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Esta técnica é um estudo da corrente em função do potencial aplicado. Logo, o registro da corrente versus o potencial é chamado voltamograma (Barbooti, 2015; Pacheco et al., 2013).

Para realizar experimentos de voltametria, são necessários pelo menos dois eletrodos. O primeiro é um eletrodo de trabalho, que está em contato com o analito e o potencial desejado é aplicado neste. O segundo eletrodo deve ter um potencial conhecido com o qual o potencial do eletrodo de trabalho pode ser ajustado, porém é muito difícil para um eletrodo manter um potencial constante enquanto passa corrente por ele. Para resolver esse problema, os papéis de fornecer um potencial de referência e fornecimento de elétrons são divididos entre um eletrodo de referência e outro eletrodo chamado, contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar. O eletrodo de referência pode ser de Ag/AgCl ou Hg/HgCl₂ e funciona como referência na medição, assim como, no controle do potencial do eletrodo de trabalho e em nenhum momento ele se polariza. Já o contra-eletrodo, que pode ser de platina, ouro, carbono vítreo, etc., é usado para completar o circuito elétrico, evitando o fluxo de corrente no eletrodo de referência (Saito & Kikuchi, 2013; Barbooti, 2015; Pacheco et al., 2013).

Para conduzir a corrente na solução, um condutor iônico, que contém íons que possam se mover livremente entre os eletrodos deve ser usado e ficará dentro de um recipiente, chamado célula. Os eletrodos são conectados a um instrumento potenciostático para criar um circuito (Figura 17). Quando um analito oxida no eletrodo de trabalho, os elétrons resultantes passam através do potenciostato até o eletrodo auxiliar e causa redução do solvente ou de algum outro componente da matriz da solução (Barbooti, 2015).

Fig. 17 Ilustração de uma configuração típica de uma análise voltamétrica.
*Fonte:(<https://betaeq.com.br/index.php/2019/07/12/a-eletoquimica-e-o-controle-de-qualidade-de-medicamentos/>)/2020.

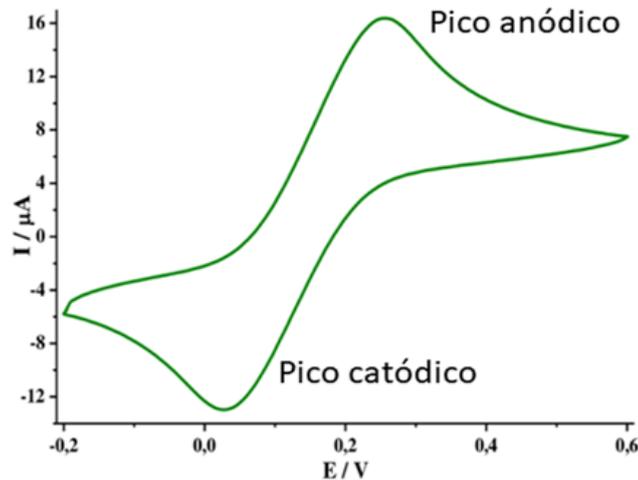


Com base nos eletrodos e nos tipos de eletrólitos, assim como, o potencial aplicado e como a corrente é medida, diferentes técnicas voltamétricas foram desenvolvidas. Entre elas, a Voltametria cíclica é uma das técnicas mais importantes que é amplamente utilizada em muitas áreas da química (Barbooti, 2015).

Na voltametria cíclica (VC), o experimento começa com aplicação de um potencial em um valor que não gera redução. A redução do analito em solução devido a variação de potencial na região catódica, leva a formação de um pico de corrente que é proporcional a concentração do analito (pico catódico). Quando o potencial atinge um determinado valor, no qual não ocorre redução, o potencial é varrido no sentido inverso até o ponto de onde partiu. No caso de uma reação reversível um pico simétrico ao da redução (pico anódico) é gerado devido a oxidação de produtos gerados no sentido direto que estavam próximos a superfície do eletrodo (Figura 18) (Pacheco et al., 2013).

Fig.18 Voltamograma cíclico.

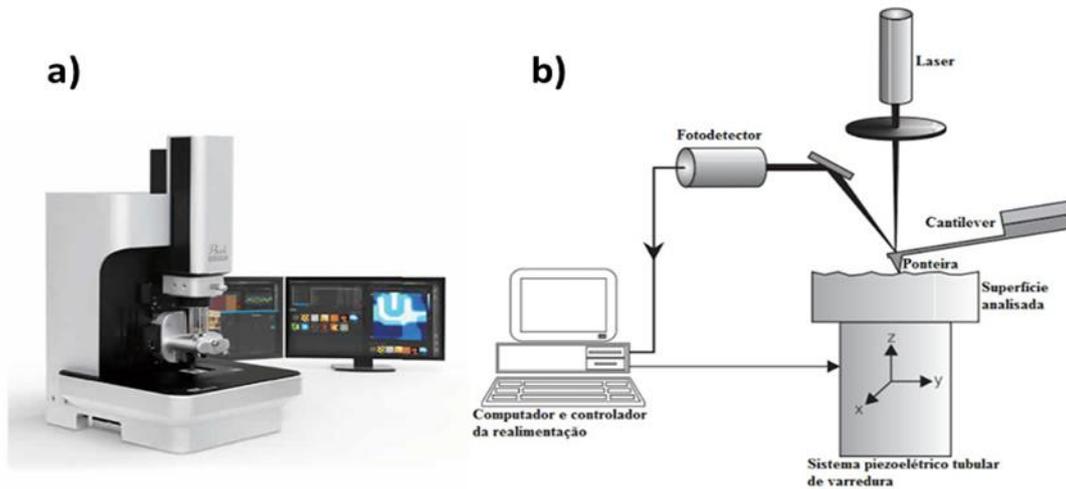
*Fonte: (<https://betaeq.com.br/index.php/2019/07/12/a-eletoquimica-e-o-controle-de-qualidade-de-medicamentos/>)/2020.



2.4.3. Microscopia Eletrônica de Força Atômica

O microscópio de força atômica (*do inglês AFM - Atomic Force Microscope*) foi desenvolvido em 1986 e teve como precursor o microscópio de varredura por tunelamento. O princípio da configuração do AFM (Figura 19), é composta por um *cantilever* que transporta uma sonda coloidal em contato com a superfície da amostra, um laser, um fotodetector e um elemento piezoelétrico de varredura. O *cantilever* contém uma ponta afiada e interage com a superfície de uma amostra que é movida nas direções x,y e z pelo elemento piezoelétrico, que gera a movimentação necessária para obtenção de imagens topográficas nas três dimensões. Um feixe de laser focado no final do *cantilever* é refletido em um detector e quando o *cantilever* experimenta uma força, por uma substância química topográfica, ou característica elétrica da amostra, o *cantilever* é desviado levando a um desvio do feixe de laser de sua posição original no detector. Esse desvio é medido como uma tensão que pode ser traduzida em força ou altura relativa (Das et al., 2015).

Fig. 19 a) Imagem de um microscópio eletrônico de varredura e b) Ilustração esquemática dos componentes gerais de um AFM. *Fonte: Cascudo et al. (2018).



No AFM, a força entre a ponta e a amostra pode ser medida em modo estático usando a deflexão do *cantilever*, no qual a ponta está fixada. O *cantilever* atua como uma mola e sua deflexão é proporcional à força entre a ponta e a amostra. Se a rigidez do *cantilever* (k = constante da mola) é conhecida, a força entre a ponta e a amostra pode ser determinada medindo a flexão do *cantilever*. Para calcular tal força, a lei de Hooke pode ser utilizada:

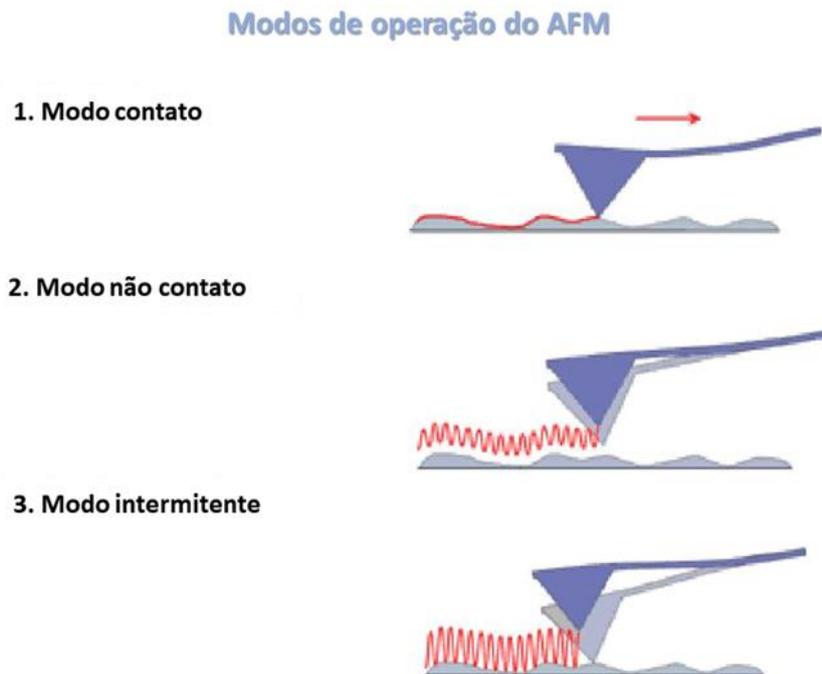
$$F = -kz \quad \text{Eq.3.}$$

Onde F é a força e z é a distância em que o *cantilever* (mola) é dobrado em relação à sua posição de equilíbrio se a amostra presente (Voigtländer, 2015).

Durante a operação, enquanto a ponta varre a superfície da amostra, ocorrem oscilações nesta como consequência de alterações na topografia da superfície, registrando variações de potencial interatômico. Em particular, monitorando a deflexão do cantilever, as características morfológicas da superfície podem ser observadas, caso a caso, definindo adequadamente as condições operacionais (Marrese, Guarino & Ambrosio, 2017).

Uma classificação adequada dos modos de operação do AFM pode ser feita em função das interações de força entre a ponta e a superfície da amostra. Em particular, o AFM trabalha no “modo de contato” na presença de constantes forças repulsivas ou no “modo não contato” na presença de forças atrativas na ponta. Por fim, o AFM pode funcionar no modo de toque ou “modo intermitente” na presença de forças atrativas e repulsivas (Figura 20) Para todas os modos de operação, às imagens podem ser reconstruídas gravando todas as interações interatômicas que ocorrem durante a varredura do *cantilever* na superfície da amostra (Marrese, Guarino & Ambrosio, 2017).

Fig. 20 Representação esquemática dos modos de operação em AFM. *Fonte: (<https://www.slideserve.com/penha/atomic-force-microscopy>)/2020.



O modo contato ocorre quando a ponta está constantemente em contato com a superfície da amostra. Enquanto isso, geralmente é usado um sistema de feedback para manter constante a deflexão do *cantilever* durante a varredura. Este modo operacional é o mais adequado para planos e superfícies rígidas como cristal, polímeros duros e tecidos, permitindo um alto nível de resolução. No modo não contato, a sonda oscilante é geralmente influenciada pela superfície próxima produzindo uma mudança na frequência ressonante, devido às forças atrativas de Van

der Waals. Portanto, os sinais gravados no modo não contato estão relacionados à variação entre a frequência ressonante do cantilever e da oscilação livre do sistema, fornecendo uma estimativa preliminar das intensidades das forças de interação entre a ponta e amostra. Nesse caso a constante de mola é maior do que no modo contato para minimizar as forças atrativas entre a ponta e a superfície da amostra. No modo intermitente a operação é semelhante ao usado no modo anterior. Contudo, o contato da ponta com a superfície da amostra ocorre de forma falsa durante cada ciclo de oscilação. Devido a perda de energia causada por um único contato intermitente, a amplitude da vibração muda drasticamente a função da topografia peculiar da superfície da amostra. É um modo empregado com sucesso para a caracterização topográfica de superfícies carregadas de células, devido a aplicação de forças mais baixas e alta resolução da imagem (Marrese, Guarino & Ambrosio, 2017).

Adicionalmente, a vantagem da técnica de AFM consiste, principalmente, no fato de que a preparação da amostra é bastante simples, economiza tempo e não induz artefatos, podendo operar sob condições ambientais ou a qualquer temperatura específica. Além disso, o AFM está ganhando um valor agregado como ferramenta útil para o design de *scaffolds*, dando oportunidade para realizar um grande número de testes de amostras de biopolímeros sob condições fisiológicas (Das et al., 2015; Alsteens et al., 2017).

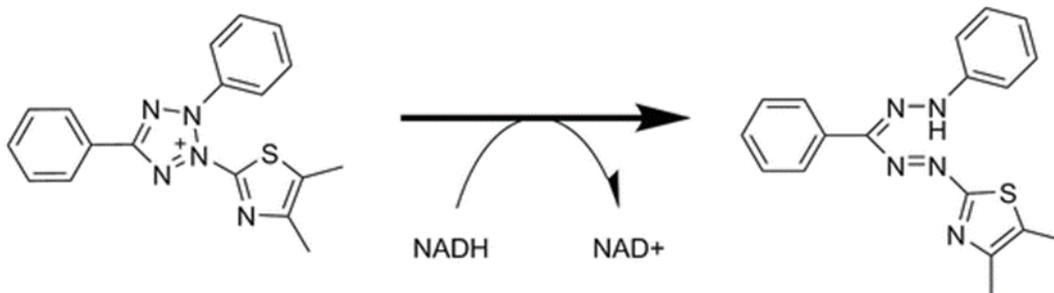
Neste trabalho, a microscopia de força atômica foi utilizada para análise morfológica das fibras poliméricas fabricadas por eletrofiliação para cultivo de CTMs, assim como, a mesma técnica serviu para caracterização topográfica do biossensor eletroquímico desenvolvido para a detecção de fungos do gênero *Candida*.

2.4.4. Teste de Viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular é frequentemente definida como o número de células viáveis em uma amostra. Muitas vezes, o mesmo ensaio utilizado para determinar a viabilidade é usado, durante um período de tempo para investigar a proliferação celular (Stoddart, 2011). Entre os ensaios de viabilidade que dependem da conversão do substrato em produto cromogênico pelas células vivas, o ensaio MTT ainda está entre um dos ensaios mais versáteis e populares. O ensaio MTT envolve a conversão do corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], amarelo

solúvel, em um sal de formazan, roxo insolúvel, pela ação da redutase mitocondrial (Figura 21) (Kumar, Nagarajan & Uchil, 2018).

Fig.21 Redução enzimática de MTT para Formazan. *Fonte: Präbst et al. (2017).



Para determinação da viabilidade celular, o Formazan formado é solubilizado e a sua concentração é determinada por densidade óptica a 590 nm, a qual é proporcional ao número de células viáveis (Kumar, Nagarajan & Uchil, 2018).

3 METODOLOGIA

3.3 Estudo eletroquímico da viabilidade de células-tronco mesenquimais na superfície de nanofibras eletrofiadas funcionalizadas por lectinas:

3.1.1 Materiais

Álcool polivinílico (PVA) ($M_w = 89.000-98.000$), quitosana (QS) (baixo peso molecular), concanavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* e aglutinina de germe de trigo (WGA) de *Triticum vulgare* adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e ácido acético glacial foram fornecidos pela Merck (Alemanha). Água ultrapura foi usada em todas as experiências após o tratamento com o sistema Millipore Milli-Q.

3.1.2 Fabricação nas nanofibras por eletrofição

Inicialmente, o PVA (10% p/v) foi preparado dissolvendo o pó em água deionizada ultrapura e agitado vigorosamente à 80 ° C por 1 h. A QS (2% p/v) foi dissolvida em ácido acético glacial (1%) e agitada magneticamente por 30 min em 24 °C. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionadas soluções das lectinas vegetais WGA e ConA a 1mg/mL as preparações de PVA e PVA / QS (80/20) e agitadas por 1 h, resultando nas respectivas formulações: PVA / ConA, PVA / WGA, PVA / QS, PVA / QS / ConA e PVA / QS / WGA. Todas as misturas foram colocadas em banho ultrassônico por 1 hora para remover as bolhas de ar.

O processo de eletrofição foi realizado à temperatura ambiente usando um aparelho de eletrofição de configuração horizontal. As misturas de polímero- lectina foram colocados em uma seringa de 20 mL com uma agulha de aço inoxidável 14G (1,6 mm). Adotamos uma distância fixa da ponta da agulha até coletor de 14,5 cm, taxa de infusão de 1µL/min fornecida por uma bomba de seringa (Bonther, Brasil) e potencial elétrico de 24 kV produzido por uma fonte de alimentação doméstica. Cada nanofibra foi formada após 10 horas de eletrofição em um coletor de metal envolto em folha de alumínio conectada ao aterramento.

Finalmente, as nanofibras eletrofiadas foram retiradas do papel alumínio, secas a 24 °C e cortadas em círculos para servirem de meio de suporte para cultivo de CTM humanas e nas caracterizações subsequentes.

3.1.3 Isolamento de células-tronco mesenquimais da geléia de Wharton humana

Os cordões umbilicais humanos foram coletados da cesariana de doadoras no Hospital De Ávila (Recife-PE) após a assinatura do consentimento informado, em conformidade com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE: 24708319.3.0000.5208) (Anexo 1). Os cordões umbilicais foram transportados em um recipiente estéril com solução salina tamponada (PBS) em EDTA (2 mM) contendo uma suplementação dos seguintes antibióticos: penicilina (150 UI/mL), estreptomicina (150 µg/mL) e anfotericina (5 µg/mL).

Posteriormente, visando o isolamento das CTMs-GW, os cordões umbilicais foram lavados e cortados longitudinalmente em segmentos de 2 cm para expor as veias e artérias que foram então cuidadosamente removidas e o tecido gelatinoso da geléia de wharton foi exposto. Em seguida, a matriz da geléia foi colocada em frascos estéreis de cultura (75 cm²) suplementados com DMEM com baixa glicose (Gibco), soro fetal bovino a 15% (FBS; LGC Biotecnologia), 20% de Ham`s F-12 (Gibco) e armazenado em uma incubadora (aquecida a 37 °C a 80% de umidade relativa, em uma atmosfera contendo 5% de CO₂).

O método de crescimento das CTMs-GW citadas foi baseado na migração espontânea das células do tecido para a superfície dos frascos, de acordo com sua propriedade de aderência ao plástico. Após 21 dias de cultura, as células foram tripsinizadas (tripsina 0,25%) e expandidas para novas garrafas. As células de segunda passagem (P2) foram utilizadas nos experimentos seguintes.

As membranas contendo as CTMs-GW foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (5x10⁵ células/poço) em volume de 3 mL de meio Low DMEM suplementado com SBF a 15%. Os períodos de incubação foram de 12, 24, 36 e 48 horas.

3.1.4 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade das membranas eletrofiadas contendo lectinas foi avaliada pelo ensaio MTT de viabilidade celular. Primeiramente, as membranas de nanofibras foram esterilizadas e depois colocadas em uma placa de cultura de 96 poços, seguido das

CTMs-GW com densidade celular de 1×10^4 células / poço e incubadas a 37°C e CO_2 a 5%. Após 24 e 48h de cultura celular, a solução de MTT (20 μL , 5mg / mL) foi adicionada a cada poço. Depois de 4 h de incubação, foi colocado em cada poço dimetilsulfóxido (DMSO-100 μL), com o objetivo de solubilizar o corante formazan. Finalmente, após 1 h de incubação, as amostras foram lidas através de um espectrofotômetro (Varioskan Flash, Thermo Scientific) no comprimento de onda de 595 nm.

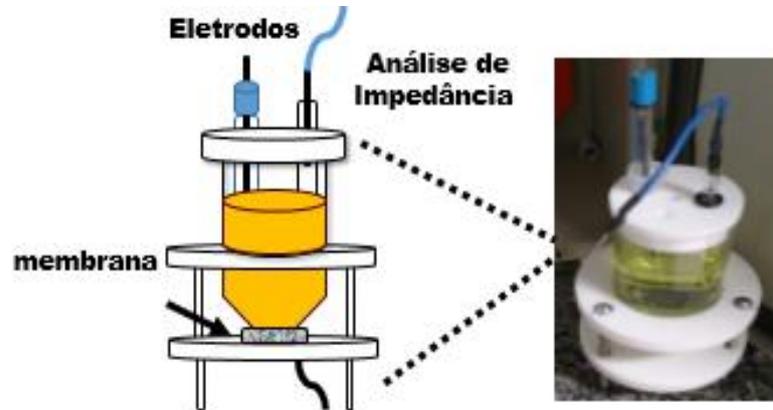
3.1.5 Análise morfológica das nanofibras

As medidas da microscopia de força atômica (AFM) foram obtidas utilizando um microscópio comercial SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japão), utilizando cantilevers com sonda de silício, constante de mola de 42 N.m^{-1} e frequências de ressonância de cerca de 300 kHz. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente ($24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), áreas de varredura de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ com resolução de 512×512 pixels. Cada amostra da nanofibra foi avaliada em duas áreas macroscopicamente diferentes antes e após cultura de células.

3.1.6 Caracterização eletroquímica

A EIE foi realizada para medir a impedância das nanofibras antes e após a exposição das CTMs-GW, apontando a relação da resistência de transferência de carga (R_{ct}) à adesão e proliferação celular. Todas as medições foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128 N (Ecochemie, Países Baixos). As membranas eletrofiadas foram dispostas em uma célula eletroquímica ligada a um contra-eletródo de fio de platina na presença de um eletródo de ouro e Ag/AgCl como eletródo de referência e imersos em uma solução 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ preparada em PBS pH 7,4 (1:1), que foi usada como sonda redox (Figura 16). A varredura de frequência variou entre 100 mHz e 100 kHz com amplitude de potencial de onda senoidal de 10 mV. Todas as medições eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente dentro de uma gaiola de Faraday.

Fig.22 Imagem da célula-eletrólítica utilizada para análise de EIE. *Fonte: (Autor próprio).



3.4 Biossensor impedimétrico eletroquímico à base de peptídeo antimicrobiano modificado (Clavanina-MO) para detecção de espécies de *Candida*.

3.2.1 Materiais

(3-aminopropil) trietoxissilano (APTES), óxido de titânio (IV) (TiO₂), ácido 3-tiofeno acético (3TAA), ácido N-hidroxissulfossuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), dimetilsulfóxido (DMSO), obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Ácido clorídrico (HCl) PA, ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]) e ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) foram adquiridos da VETEC (Brasil). A clavanina-MO foi sintetizada pela Peptide 2.0 (EUA) usando a fase sólida com a estratégia N-9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc). Em seguida, o peptídeo foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), obtendo uma pureza superior a 95%. Todos os materiais utilizados neste estudo foram previamente esterilizados. Utilizou-se o método padrão de inoculação de diferentes espécies de *Candida*, cujo crescimento ocorreu no Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com cloranfenicol por 24 horas a 37 ° C. Água de alta pureza foi obtida a partir de um equipamento Millipore Milli-Q plus (Billerica, EUA).

3.2.2 Modificação química das NPsTiO₂

A modificação química das NPsTiO₂ consistiu na adição de grupos amino em sua superfície. Para isso, foi utilizado 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) via reação de co-condensação. Esse procedimento foi baseado no método relatado por Patra et al (2014).

Primeiramente, 0,5g de NPsTiO₂ foram dispersos em aproximadamente 50 mL de DMSO. A dispersão foi sonicada durante cerca de 1 hora. Subsequentemente, 400 µL de APTES foram adicionados à solução que permaneceu durante a noite sob agitação. Finalmente, as nanopartículas foram lavadas com metanol para remover o excesso de APTES e, após filtração, secas a 60 ° C em estufa.

3.2.3 Medidas eletroquímicas

Os dados eletroquímicos foram obtidos usando um potenciostato/ galvanostato PGSTAT 128N (Ecochemie, Metrohm Autolab, The Netherlands) conectado ao software NOVA 1.11 controlado 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. O biossensor foi construído sobre uma superfície de ouro, conhecido como eletrodo de trabalho, assim como foi acoplado ao sistema um contra-eletrodo de fio de platina e um eletrodo de Ag/AgCl (em 3M KCl) como eletrodo de referência. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas a 24 °C ± 1, dentro de uma gaiola de Faraday. O eletrodo do disco de ouro foi inicialmente polido em lixa com água deionizada. Para uma limpeza completa, permaneceu 30 minutos embebido em NaClO. Finalmente foi enxaguado com água ultrapura e, em seguida, iniciado a construção da plataforma.

3.2.4 Preparação eletroquímica de filmes de PTAA

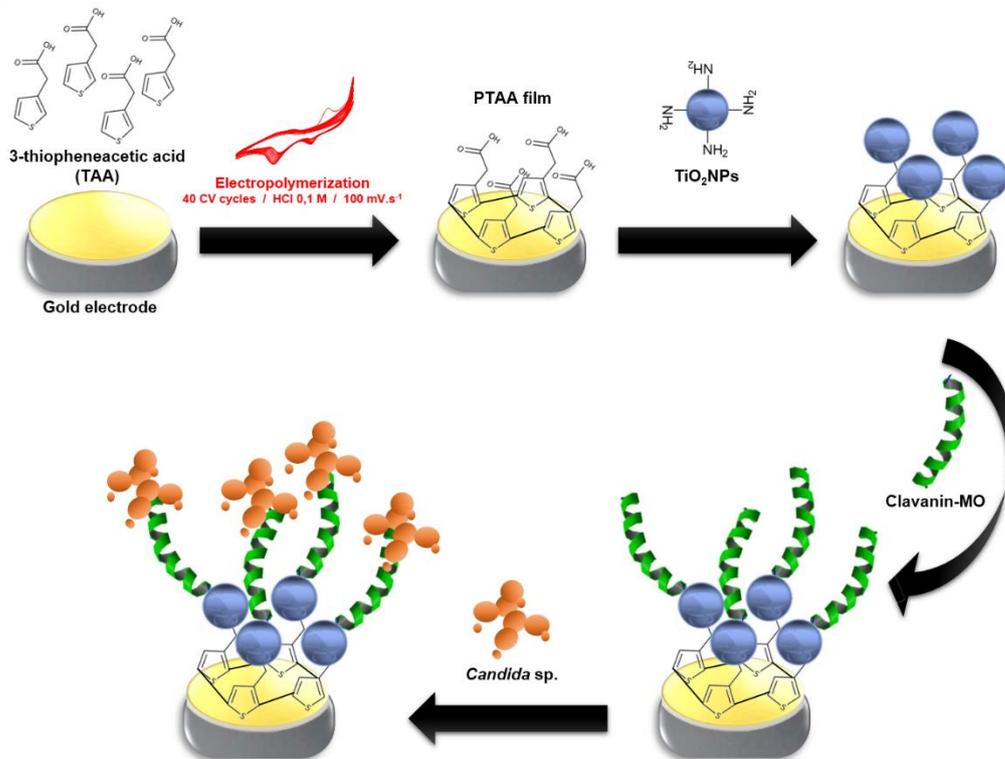
Inicialmente, 20 mL de uma solução 0,5 M de ácido tiofeno-3- acético (3TAA) em HCl (0,1 M) foram preparados e, em seguida, foi realizada a polimerização do monômero 3TAA em poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA). O filme PTAA foi preparado por polimerização potenciostática pela técnica de voltametria cíclica (VC) na superfície do eletrodo de ouro, posicionada paralelamente a um eletrodo de referência e um

contra-eletrodo. Através do 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⁻¹. Finalmente, o filme foi lavado com água deionizada para remover monômeros não adsorvidos.

3.2.5 Preparação da plataforma biossensora

Após a polimerização do eletrodo, como mencionado na etapa anterior, prosseguimos com a preparação da plataforma nanoestruturada. Para ativar os agrupamentos carboxílicos livres do filme de PTAA e o acoplamento dos seguintes grupos amino, foi aplicado EDC:NHS por 2 minutos. Em seguida, 2µL da solução de TiO₂NPs-APTES foram pingados no eletrodo modificado. Após o tempo de incubação de 10 minutos, o EDC:NHS foi novamente adicionado para ativar os grupos amino livres presentes nas moléculas de APTES. Para finalizar o sistema sensor, o eletrodo previamente modificado por PTAA_EDC: NHS_TiO₂NPs-APTES_EDC:NHS foi submetido a 2µL de solução de Clavanina-MO (615,38µM) por 10 minutos. Assim, 2µL de solução (25° C) contendo diferentes concentrações (10¹ a 10⁶ UFC mL⁻¹) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* foram incubadas na superfície do eletrodo de ouro modificado por 10 minutos cada, seguido da análise eletroquímica. Todas as medições foram realizadas em triplicado a 25 °C. Um diagrama esquemático com o processo de montagem do biossensor é mostrado na Fig. 23.

Fig.23 Diagrama esquemático para a construção do biossensor modificado com PTAA/TiO₂NPs /CLAVMO.



3.2.6 Análise por microscopia de força atômica

As caracterizações morfológicas do biossensor antes e após interação com *Candida spp.* foram realizadas usando um microscópio de força atômica SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japão). Cantilevers com uma sonda AFM de silício (Nanoworld, Japão, frequência ressonante de 300 kHz, constante de força de mola de 3 N.m⁻¹) foram utilizados em modo sem contato (24 °C ± 1°C). As imagens foram definidas em 512x512 pixels com área de digitalização de 5 x 5 µm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3 Estudo eletroquímico da viabilidade de células-tronco mesenquimais na superfície de nanofibras eletrofiadas funcionalizadas por lectinas.

4.1.1. Análise Topográfica

A Fig. 24 e a Fig. 25 mostram os resultados obtidos a partir de membranas de PVA e PVA-QS, respectivamente. Inicialmente, observamos que ambas as amostras primitivas apresentam estruturas semelhantes a fibras com altura muito semelhante (260 e 278 nm, respectivamente). Após sua funcionalização com lectinas, observamos que o WGA produz um aumento de altura de 10 nm em ambos os materiais. Em comparação com a funcionalização de ConA, pode-se dizer que sua afinidade é maior, pois a altura da membrana de PVA-ConA aumentou de 260 nm para 287 nm e a de PVA / QS-ConA aumentou de 278 nm para 311 nm (aumento de 27-33 nm cada). Além disso, as membranas funcionalizadas com ConA tiveram uma mudança morfológica mais evidente. Em geral, as amostras de PVA-QS apresentam superfícies mais lisas compostas por protuberâncias nanométricas. Após o crescimento de CTM-GWH, as superfícies tornaram-se mais ásperas e maiores alturas foram observadas. É importante ressaltar que, devido ao tratamento de fixação, a morfologia de todas as amostras analisadas é diferente de seu estado hidratado. No entanto, os aumentos de altura e morfologia surgem, sem dúvida, da quantidade de células dessecadas ou de lectinas aderidas.

Fig.24 Micrografias de AFM de nanofibras secas. PVA puro (a), PVA_WGA (b), PVA_ConA (c), PVA_QS(d), PVA_QS_WGA (e), PVA_QS_ConA (f).

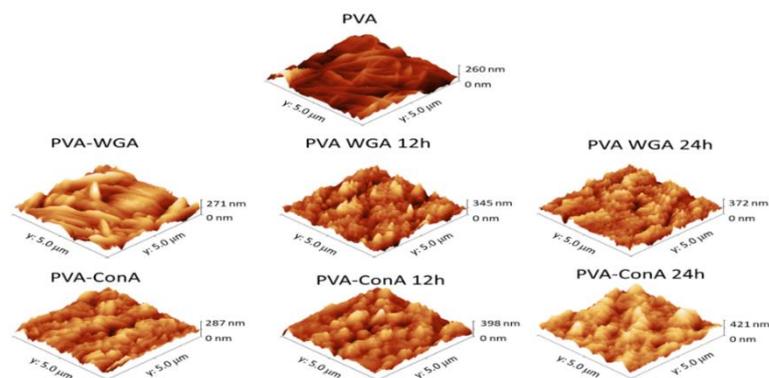
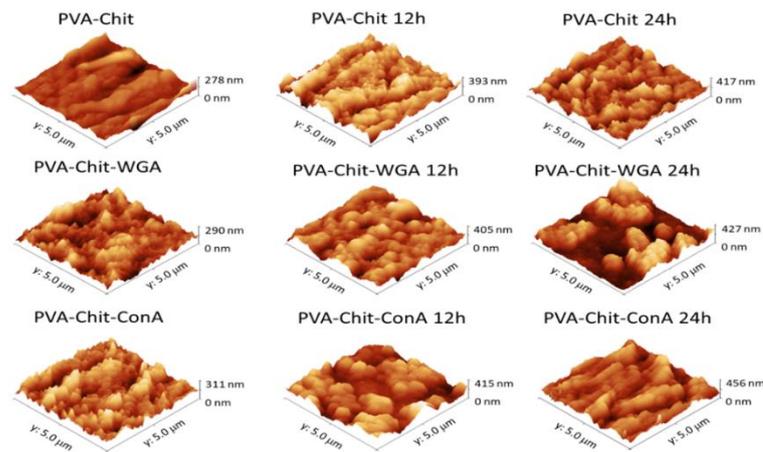


Fig. 25 Micrografias de AFM das nanofibras após a incubação. a) PVA_WGA 12 horas de incubação, b) PVA_ConA 12 horas de incubação, c) PVA_Chitosan 12 horas de incubação, d) PVA_QS_WGA 12 horas de incubação, e) PVA_QS_ConA 12 horas de incubação, f) PVA_WGA 24 horas de incubação, g) PVA_ConA 24 horas de incubação, h) PVA_QS 24 horas de incubação, i) PVA_QS_WGA 24 horas de incubação, j) PVA_QS_ConA 24 horas de incubação.

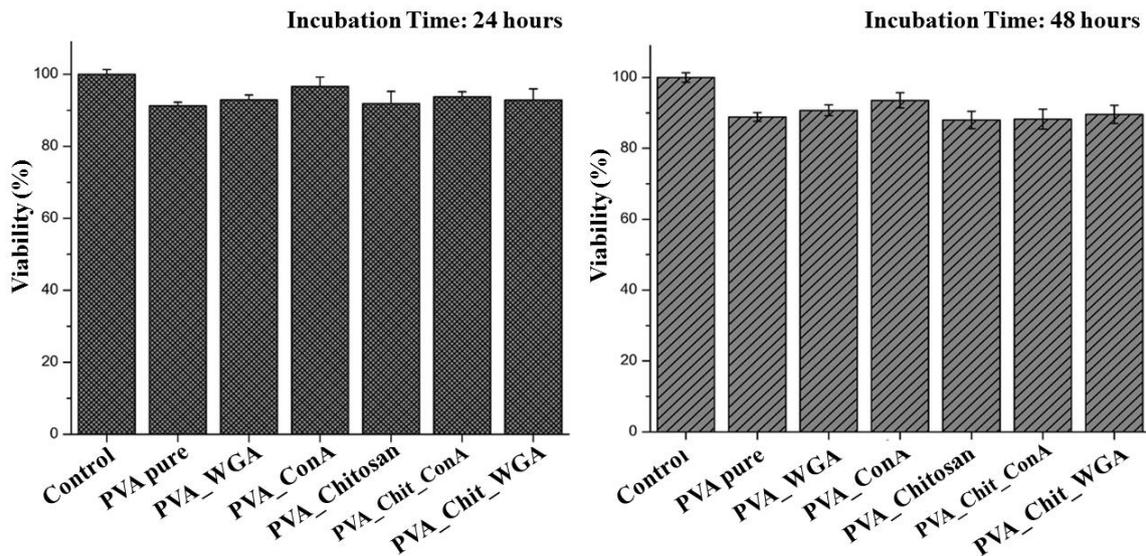


4.1.2. Ensaio de Viabilidade

As células viáveis transformam a solução de MTT amarelo claro em cristais de formazan azul escuro. Assim, a produção de formazan indica indiretamente que as células estão vivas. A Fig. 26 mostra que CTM-GWH produziu formazan às 24 e 48 horas. Além disso, observamos taxas de viabilidade de mais de 95% de viabilidade em todos os grupos testados durante os períodos de 24 e 48 horas. Nossos poços de controle (membranas com meio de cultura e CTM) mostram que não ocorreu contaminação e que os materiais usados na mistura polimérica não reagem com o MTT. Nossos resultados demonstram que a adição de lectinas melhora a viabilidade celular em estruturas de PVA. Por exemplo, em comparação com tapetes PVA-puros (amostras de controle), a adição de WGA já aumenta a viabilidade celular, no entanto, tapetes funcionalizados com ConA apresentam uma cor azul mais escura, indicando aumento da biocompatibilidade. Esse comportamento é esperado, uma vez que a adição de ConA a materiais poliméricos, metais e plásticos já demonstrou aumentar a adesão celular (Anselme, 2000). Por outro lado, quando o PVA já está associado à quitosana, o efeito das lectinas é mínimo. As viabilidades permanecem muito

semelhantes para os três PVA / QS, PVA-WGA / QS e PVA-ConA /QS, sugerindo, portanto, que a interação adesiva já é conduzida pela presença da própria QS, cuja estrutura química é muito semelhante aos glicosaminoglicanos da MEC da GWH (Lange et al., 2002).

Fig. 26 Ensaio de viabilidade celular após 24 e 48 horas de incubação.



4.1.3. Análise impedimétrica

Medidas impedimétricas foram realizadas a cada 12 h para monitorar o crescimento e a adesão na matriz polimérica. A Fig. 27 mostra a impedância faradaica antes e depois da incubação das CTM-GWH. Observamos que as menores respostas são encontradas no início dos experimentos. O aumento progressivo na adesão celular resultou em aumentos significativos na resistência à transferência de elétrons. Os valores de R_{ct} para superfícies de fibras modificadas por CTM-GWH são mostrados na Tabela 1. Observamos que as características dielétricas da rede polimérica são modificadas após a adsorção celular em sua superfície. O aumento da resistência eletrônica indica aderência das CTM-GWH à superfície das fibras poliméricas e como esperado, no processo de adesão e proliferação, observou-se maior resistência.

Fig. 27 Diagramas de Nyquist das nanofibras expostas às células-tronco. PVA_ConA (a), PVA_WGA (b), PVA_Quitosana (c) PVA_QS_ConA (d), PVA_QS_WGA (e) em momentos diferentes.

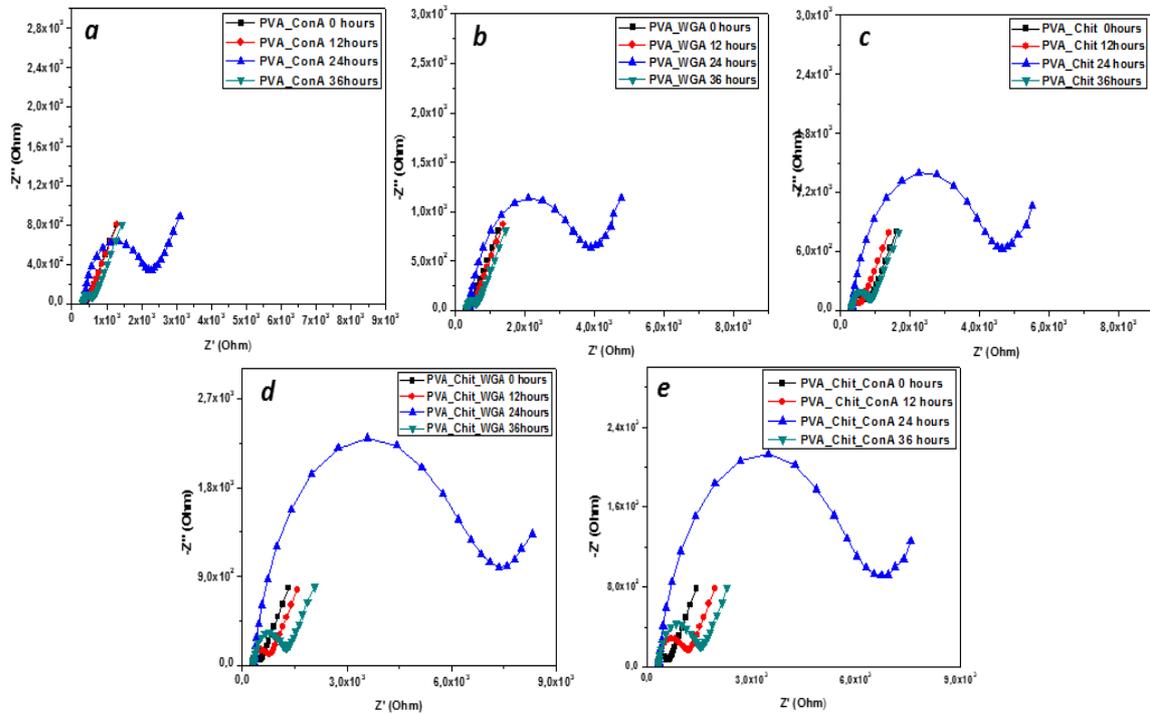


Tabela 1. Valores dos elementos de circuito equivalentes a partir dos resultados da impedância ajustada.

Time (Hours)	R_s	Q	R_{ct}	W
PVA-ConA				
0	316 Ω	8.13 μ Mho	128 Ω	1080 μ Mho
12	318 Ω	14.1 μ Mho	150 Ω	1070 μ Mho
24	327 Ω	2.87 μ Mho	1850 Ω	944 μ Mho
36	322 Ω	6.06 μ Mho	280 Ω	1060 μ Mho
PVA-WGA				
0	303 Ω	15.1 μ Mho	110 Ω	1080 μ Mho
12	367 Ω	28.2 μ Mho	122 Ω	1050 μ Mho
24	370 Ω	2.87 μ Mho	41200 Ω	20.0 μ Mho

36	358 Ω	8.04 μ Mho	1090 Ω	86.9 μ Mho
PVA-Chitosan				
0	306 Ω	5.77 μ Mho	473 Ω	1080 μ Mho
12	307 Ω	11.4 μ Mho	266 Ω	1090 μ Mho
24	315 Ω	2.88 μ Mho	4050 Ω	753 μ Mho
36	312 Ω	4.43 μ Mho	530 Ω	1070 μ Mho
PVA-Chit-ConA				
0	307 Ω	4.95 μ Mho	290 Ω	1111 μ Mho
12	301 Ω	4.80 μ Mho	818 Ω	1090 μ Mho
24	317 Ω	2.13 μ Mho	5850 Ω	599 μ Mho
36	310 Ω	2.83 μ Mho	1150 Ω	1050 μ Mho
PVA-Chit-WGA				
0	305 Ω	5.90 μ Mho	208 Ω	1100 μ Mho
12	296 Ω	6.59 μ Mho	470 Ω	1100 μ Mho
24	326 Ω	2.12 μ Mho	6420 Ω	551 μ Mho
36	308 Ω	3.39 μ Mho	903 Ω	1050 μ Mho

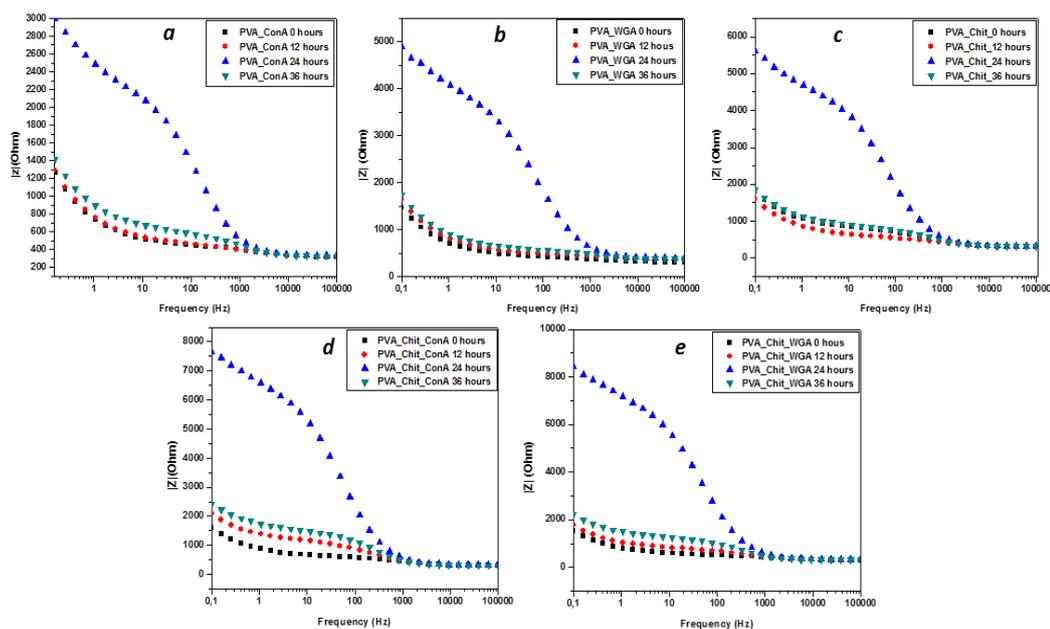
O processo de adesão celular por meio de interações célula-matriz ou célula-célula está associado a integrinas, caderinas, membros da superfamília de imunoglobulinas e selectinas (Guo et al., 2006). A interação das moléculas da membrana celular e dos grupos funcionais dos polímeros ocorre devido à adesão não específica, como ligações de hidrogênio, eletrostáticas, polares ou iônicas (Bačáková et al., 2000). A interação fraca ocorre devido à ausência de proteínas da matriz extracelular (MEC) (Bačáková et al., 2004). Assim, a melhoria da adesão e crescimento celular em superfícies sem MEC é obtida por meio do uso de materiais de revestimento com diferentes moléculas biológicas que podem fornecer as

propriedades adesivas e o ambiente necessário para a adesão e sobrevivência celular (Sachlos et al., 2003).

A aderência do HWJ-MSG resulta em uma diminuição da área de superfície ativa. Além disso, pode-se observar um aumento do efeito de barreira contra a transferência de elétrons entre a matriz polimérica e a superfície do eletrodo. Em trabalhos anteriores, o EIE já foi utilizado para avaliar a adesão de células HeLa em filmes de anticorpo / metal / polissacarídeo (Jiang et al., 2010). Assim, o EIE pode ser considerado uma técnica útil para avaliar a aderência do CTM-GWH à superfície do polímero.

Os gráficos de Bode das fibras poliméricas e dos sistemas de fibras-CTM-GWH são mostrados na Fig. 28. Como pode ser visto, a resistência em alta frequência é comum a todos os sistemas. No entanto, os gráficos de Bode mostram diferenças na magnitude da impedância em frequências baixas, sendo mais altas para membranas com células. Portanto, o aumento da resposta dielétrica aos sistemas CTM-GWH pode ser explicado por processos de relaxamento de íons devido ao bloqueio do deslocamento de íons que surge na superfície das membranas (Gheorghe & Guiseppi-Elie, 2003).

Fig. 28 Diagramas de Bode das nanofibras expostas às células-tronco. PVA_ConA (a), PVA_WGA (b), PVA_Quitosana (c) PVA_QS_ConA (d), PVA_QS_WGA (e) em momentos diferentes.



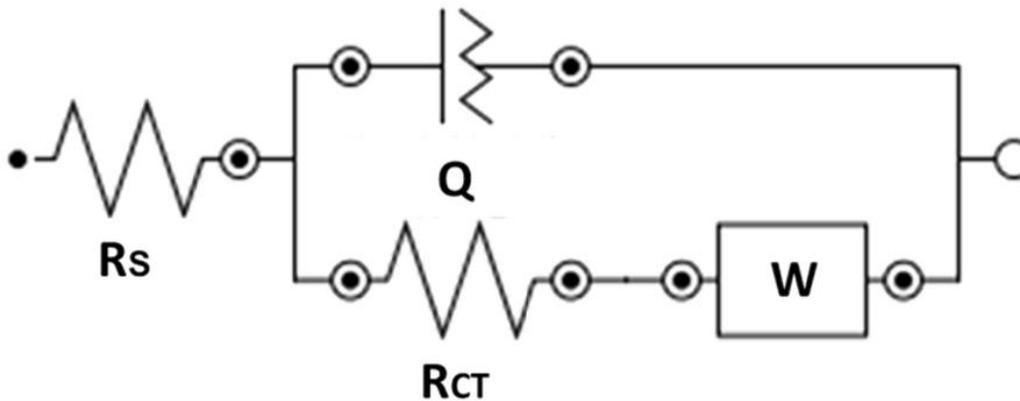
É importante notar que esses resultados também podem sugerir de alterações na membrana celular. Na verdade, um estudo recente que explorou a diferenciação de células-tronco por meio do monitoramento de medidas de impedância em uma frequência específica, encontrou resultados semelhantes em relação ao desenvolvimento dos estágios de crescimento e proliferação (Angstamann et al., 2011). Dessa forma, nossos resultados mostram um aumento inicial da resposta impedimétrica durante as primeiras 24 h da fase de adesão das CTM-GWH, sendo que desta vez ocorreu uma queda drástica na fase de proliferação. Para as mudanças morfológicas mais prováveis das células, endossar o rearranjo e a distribuição da densidade nos arca-bouços das nanofibras. As CTM-GWH aderiram e se espalham nas membranas durante o cultivo e estudos anteriores demonstraram diferenças eletroquímicas em culturas de células devido a alterações na morfologia celular, cobertura celular e interações célula-substrato (Low et al., 2017).

Aproveitando a não invasividade da espectroscopia de impedância, nosso grupo está atualmente preparando um estudo mais detalhado para avaliar a possibilidade de processos de diferenciação celular que poderiam estar ocorrendo durante as 36 horas iniciais para melhor explicar o comportamento da impedância observado em frequências mais altas (Giaever & Keese, 1993).

O circuito elétrico mostrado na Fig. 29 representa a interface elétrica associada ao uso de membranas de nanofibra como suporte para células de cultura. Os valores experimentais foram ajustados usando o software NOVA, e os dados obtidos estão descritos na Tabela 1. A modelagem de circuito equivalente fornece os meios para extrair a contribuição de componentes individuais (células aderidas, andaimes e meios eletroquímicos) da resposta de impedância geral. O circuito equivalente proposto é composto por uma resistência ôhmica da solução eletrolítica (R_s) e impedância Warburg (W), que representa as propriedades gerais da solução eletrolítica e as capacidades de difusão da solução redox, respectivamente. Além disso, as propriedades interfaciais da superfície estão associadas a uma capacitância dupla (C_{dl}) e resistência de transferência de elétrons (R_{ct}). R_{ct} controla a taxa de transferência de elétrons interfacial entre a solução e o eletrodo. Além disso, R_{ct} é equivalente ao diâmetro do semicírculo em frequências mais altas. Nossos resultados demonstram que as mudanças em R_{ct} foram mais significativas do que os outros

parâmetros de impedância. Assim, R_{ct} é o sinal mais apropriado para avaliar as propriedades interfaciais das fibras poliméricas durante o procedimento de adesão celular.

Fig. 29 Circuito equivalente usado para ajustar os resultados experimentais, onde R_s representa a resistência ôhmica da solução eletrolítica, Q é o elemento constante de fase, W é a impedância de Warburg e R_{ct} é a resistência de transferência de carga.



No momento, nossa atenção é atraída para as maiores magnitudes R_{ct} encontradas para todas as esteiras aderidas a CTM-GWH. Portanto, a adesão celular foi avaliada quantitativamente pelo cálculo da variação relativa da resistência de transferência de elétrons (ΔR_{ct}), como segue:

$$\Delta R_{ct}\% = \left(\frac{R(f-HWJMSC) - R_f}{R_f} \right) \times 100 \quad , \quad (1)$$

onde R_f é o valor da resistência de transferência de elétrons do tapete puro antes da inoculação e R_f - CTM-GWH é o valor da resistência de transferência de elétrons dos tapetes após a inoculação das CTM-GWH. As curvas de Cole-Cole exibiram uma resposta de impedância crescente durante a interação das fibras poliméricas com as CTM-GWH quando comparadas às esteiras não modificadas. Os valores de ΔR_{ct} se correlacionam bem com o número de CTM-GWH ligados à superfície das fibras poliméricas. Portanto, nossos resultados demonstram a conveniência que a técnica EIE oferece no monitoramento da dinâmica de crescimento de andaimes cultivados com CTM-GWH. Além disso, uma avaliação impedimétrica permite uma análise contínua das culturas sem perturbar seu crescimento, que é uma característica importante necessária para o transplante de andaimes de cultura em engenharia de tecidos. A adesão é essencial para determinar a adequação dos dispositivos médicos

implantáveis para uso no organismo. Assim, uma interação estável entre a superfície dos materiais e o tecido circundante também é essencial para o sucesso a longo prazo dos implantes (Demestrecu et al., 2010).

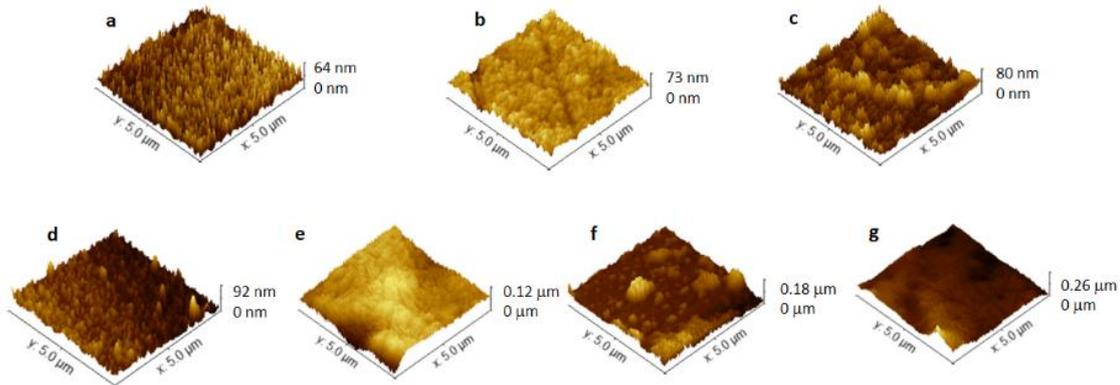
Os possíveis mecanismos de adesão celular nas esteiras poliméricas podem ser listados como segue: (i) adesão biológica integrada, (ii) adesão química controlada por composição e molhabilidade, e (iii) adesão física controlada por porosidade e rugosidade (Lee et al., 2004). Nesse contexto, saber que a adesão celular é influenciada de acordo com o grau de rugosidade e hidrofobicidade da superfície polimérica (Anselme et al., 2000). Nossos resultados confirmam que a adesão celular a materiais nanoporosos, como membranas de eletrofiliação, pode ser aumentada por meio da adição de biomoléculas ou da composição química da mistura (Ruardy et al., 1995).

4.4 Biossensor impedimétrico eletroquímico à base de peptídeo antimicrobiano modificado (Clavanina-MO) para detecção de espécies de *Candida*.

4.4.2 Análises morfológicas do sistema sensor

A Fig. 30 mostra as imagens capturadas pelo AFM durante o processo de montagem da plataforma e teste do biossensor. Na Fig. 30a, uma camada bem distribuída de 64 nm de PTAA é encontrada cobrindo homogeneamente a superfície. Após a imobilização covalente do $\text{NH}_2\text{-TiO}_2\text{NPs}$, a altura média do filme aumenta para 73 nm (Fig. 30b); este resultado está em conformidade com o tamanho das nanopartículas imobilizadas. Após a imobilização covalente de CLAV-MO apresentada na Fig 30c, a altura aumenta para 80 nm. Sua distribuição heterogênea na superfície havia ocorrido provavelmente devido à grande área superficial trazida pelas nanopartículas de TiO_2 , esse comportamento era esperado uma vez que uma topografia semelhante foi observada em relatórios anteriores (de Miranda et al., 2017; Silva Junior et al. , 2018). Finalmente, a superfície do biossensor foi estudada após sua exposição a quatro amostras de *Candida*: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. krusei*. A biointeração foi confirmada pelas mudanças na topografia da superfície e altura nas Figs. 30d, 30e, 30f e 30g, respectivamente.

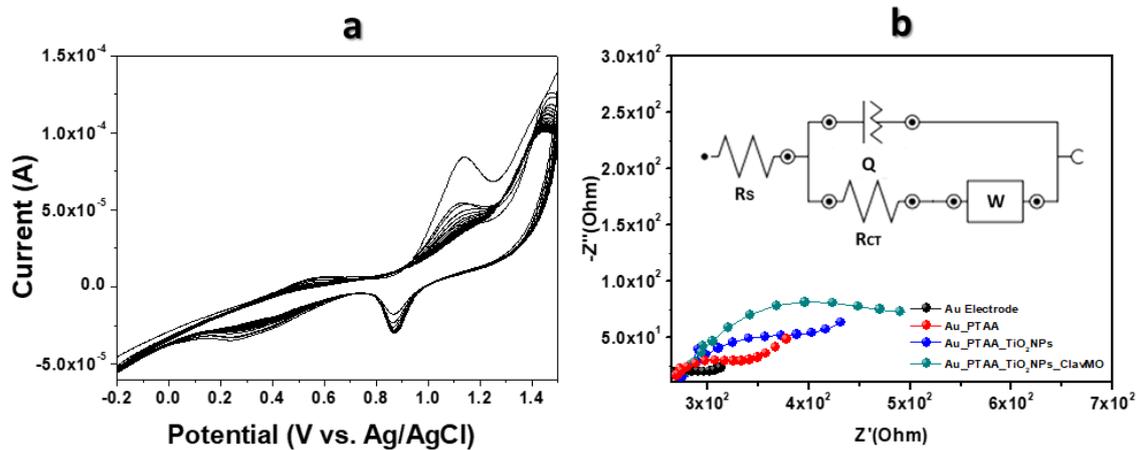
Fig. 30 Imagens 3D AFM do eletrodo de trabalho de ouro revestido com filmes PTAA (a), PTAA_TiO₂NPs (b), PTAA_TiO₂NPs_CLAVMO (c), PTAA_TiO₂NPs_CLAVMO_ *C. Krusei* (d), PTAA_TiO₂NPs_CLAVMO_ *C. glabrata* (e), PTAA_TiO₂NPs_CLAVMO_ *C. tropicalis* (f) e PTAA_TiO₂NPs_CLAVMO_ *C. albicans* (g).



4.4.3 Análises eletroquímicas

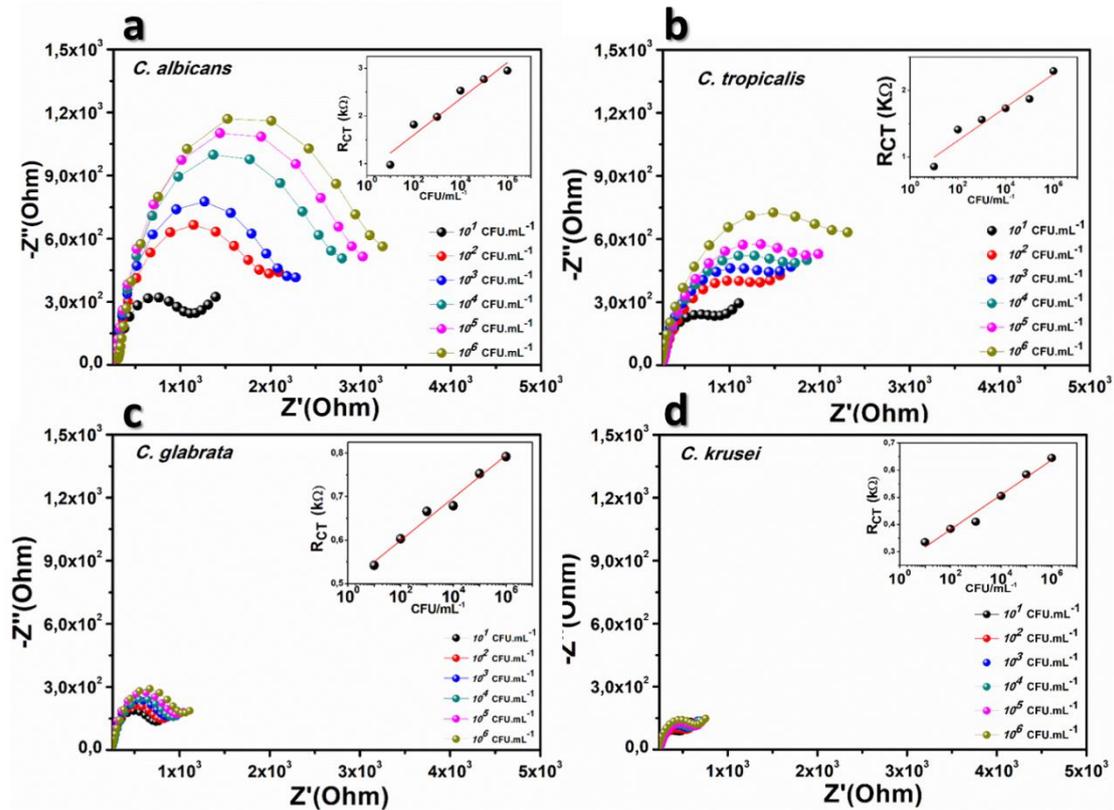
A eletropolimerização de 3-TAA é mostrada na Fig 31a. A corrente do pico anódico em torno de 1,12 V diminui no voltamograma. Além disso, uma ligeira mudança contínua em direção a potenciais mais elevados pode ser observada. Este comportamento está associado ao aumento da espessura do filme após cada ciclo de polimerização e, portanto, ao aumento da resistência à transferência de carga (Fig. 31b linha vermelha $R_{ct} = 1240 \Omega$). Além disso, o pico anódico em torno de 0,53 V surge da dopagem de filme polimérico, enquanto os picos catódicos em torno de 0,28 V e 0,87 V estão respectivamente associados à redução de prótons e de-dopagem das cadeias poliméricas oxidadas durante a varredura reversa. Os grupos carboxila presentes no filme PTAA foram covalentemente ligados aos TiO₂NPs aminados pela química EDC:NHS. Como resultado, a caracterização do EIS mostra que a resposta impedimétrica (Fig. 31b linha azul) aumenta para $R_{ct} = 1370 \Omega$. A adição de TiO₂NP aumenta a sensibilidade e detecção analítica da plataforma do biossensor por meio de área ativa aumentada (Bai e Zhou, 2014; Shetti et al., 2019). Após a imobilização covalente de CLAVMO, um novo aumento no diâmetro do semicírculo foi observado (Fig. 31b curva verde, $R_{ct} = 1790 \Omega$). Alguns atributos físicos do peptídeo, como superfície catiônica e aminoácidos hidrofóbicos, podem promover aumento da resistividade (Nguyen et al., 2011).

Fig. 31 Processo de montagem do biossensor. VCs de polimerização do TAA registrados em 20 mL de HCl 0,1 M, taxa de varredura potencial: 100 mV s⁻¹ (a). Caracterização EIE da plataforma em cada etapa de montagem (b); Inserção: Circuito equivalente adotado para ajustar os dados de impedância.



Para avaliar a seletividade e sensibilidade do biossensor, diferentes amostras de *Candida* foram testadas em seis concentrações diferentes. Em cada medição, o biossensor foi incubado por 10 min com 2 μ L de cada amostra. A plataforma de detecção foi preparada de fresco antes da medição. As respostas impedimétricas obtidas após a interação com os microrganismos avaliados são mostradas na Fig. 32. No geral, descobrimos que a altura do arco do círculo aumenta com a presença de uma maior concentração de microrganismos. Esse efeito está relacionado à aderência das células ao biossensor, formando uma camada que dificulta a proximidade da sonda redox à superfície de transferência de elétrons.

Fig. 32 Gráficos de Nyquist do biossensor baseado em peptídeo após exposição a diferentes concentrações (10^1 a 10^6 UFC mL^{-1}) de espécies patogênicas de *Candida*: *C. albicans* (a), *C. tropicalis* (b), *C. glabrata* (c) e *C. krusei* (d).



O ajuste matemático dos gráficos de Nyquist em um modelo de circuito equivalente de Randles foi realizado para avaliar analiticamente os parâmetros do espectro de impedância. Este circuito equivalente compreende a resistência da solução eletrolítica (RS) inserida como um elemento em série, um elemento de fase constante (Q) representando a pseudo-capacitância da camada dupla formada na interface do eletrodo, uma resistência de transferência de carga (R_{ct}) e o elemento de difusão Warburg (W) refletindo as propriedades do eletrólito. Os valores obtidos para cada componente estão listados na Tabela 2. Digno de nota, os fatores Q e n registrados após a imobilização de TiO_2NPs confirmaram o aprimoramento das propriedades eletroquímicas da plataforma. Durante o teste dos biossensores, nota-se que em densidades de levedura mais altas, R_{ct} aumenta linearmente. Além disso, a pseudocapacitância aumenta pelo fator n, revelando assim o bloqueio de carga na

superfície do sensor devido ao acúmulo de massa específica. A variação relativa do Rct (ΔR_{CT}) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \left| \frac{R_{CT}(Candida) - R_{CT}(Biosensor)}{R_{CT}(Biosensor)} \right| \times 100 \quad (2)$$

Onde Rct (*Candida*) corresponde aos valores de Rct após o reconhecimento da levedura promovido pelo CLAV-MO, e Rct (Sensor) é a resposta basal do biossensor. A Fig.33b mostra a variação do ΔR_{CT} em resposta às diferentes concentrações (UFC mL⁻¹) de *Candida* spp. Foi observada uma relação linear entre as quantidades de *Candida* e o ΔR_{CT} . Os valores de ΔR_{CT} aumentam da seguinte forma: *C. krusei* < *C. glabrata* < *C. tropicalis* < *C. albicans* e suas equações de correlação linear são $y = 41,154 + 15,562 * (\ln x)$; $y = 179,997 + 11,874 * (\ln x)$; $y = 318,987 + 60,309 * (\ln x)$ e $y = 371,503 + 91,988 * \ln(x)$, respectivamente. Os limites de detecção (calculados como $LOD = 3,33 \sigma / S$) foram 2,33; 2,04; 3,73 e 3,84, respectivamente. Digno de nota, os LODs da levedura haplóide foram menores do que os diplóides.

Para entender o progresso de captura de leveduras, a cobertura (θ) da superfície do biossensor pode ser calculada da seguinte forma:

$$\theta = 1 - \frac{R_{ct}(Biosensor)}{R_{ct}(Candida)}, \quad (3)$$

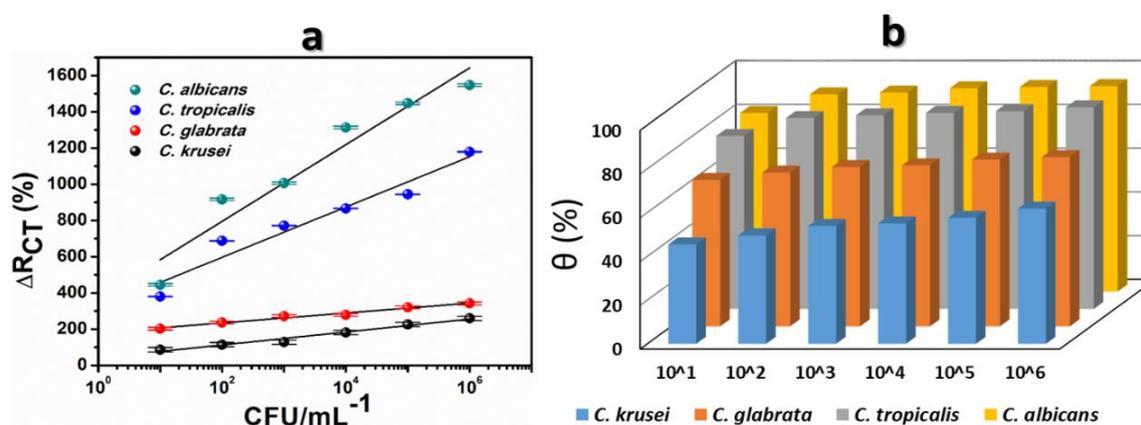
onde Rct (Biossensor) é a resistência de transferência de carga para o sistema biossensor inicial e Rct (*Candida*) é a resistência de transferência de carga registrada após a interação com amostras de *Candida* spp. O revestimento da superfície representa os locais de reconhecimento CLAV-MO disponíveis já ocupados por leveduras, os resultados são mostrados plotados na Fig. 33b como $\theta\%$ em função da concentração da amostra. Uma relação diretamente proporcional foi observada, onde $\theta\%$ aumentou com o aumento da quantidade de *Candida* limitada de 10¹ a 10⁶ UFC mL⁻¹. De 10¹ UFC mL⁻¹ $\theta\%$ aumentou visivelmente em todas as amostras e em 10³ UFC mL⁻¹ $\theta\%$ é encontrado para ser 88% e 91% para *C. tropicalis* e *C. albicans* respectivamente, enquanto *C. glabrata* e *C. krusei* apresentaram valores mais baixos, 73% e 53% respectivamente.

Tabela 2. Valores dos elementos de circuito equivalente a partir dos resultados da impedância ajustada.

Modified electrode	<i>Candida</i>			
	concentration (CFU mL ⁻¹)	R _{CT} (k Ω)	Q (μ S)	n
Bare gold electrode	-	0.101	0.216	0.442
PTAA	-	0.124	0.314	0.373
PTAA_TiO ₂ NPs	-	0.137	0.304	0.619
PTAA_TiO ₂ NPs_ClavaninMO	-	0.179	0.266	0.371
ClavaninMO_ <i>C. albicans</i>	10 ¹	0.976	7.97	0.667
	10 ²	1.82	4.4	0.672
	10 ³	1.98	2.96	0.689
	10 ⁴	2.53	2.54	0.712
	10 ⁵	2.77	2.27	0.719
	10 ⁶	2.95	2.15	0.733
ClavaninMO_ <i>C. tropicalis</i>	10 ¹	0.856	18.4	0.648
	10 ²	1.41	16.2	0.654
	10 ³	1.56	13.4	0.673
	10 ⁴	1.73	11.9	0.685
	10 ⁵	1.87	10.6	0.697
	10 ⁶	2.29	8.76	0.715
ClavaninMO_ <i>C. glabrata</i>	10 ¹	0.542	10.4	0.731
	10 ²	0.603	8.88	0.747
	10 ³	0.66	8.02	0.758

	10^4	0.679	7.41	0.766
	10^5	0.753	6.88	0.775
	10^6	0.792	6.35	0.784
<hr/>				
ClavaninMO_ <i>C. krusei</i>	10^1	0.328	38.3	0.597
	10^2	0.355	32.8	0.613
	10^3	0.388	22.9	0.651
	10^4	0.398	22.1	0.655
	10^5	0.422	20.8	0.661
	10^6	0.469	18.7	0.672

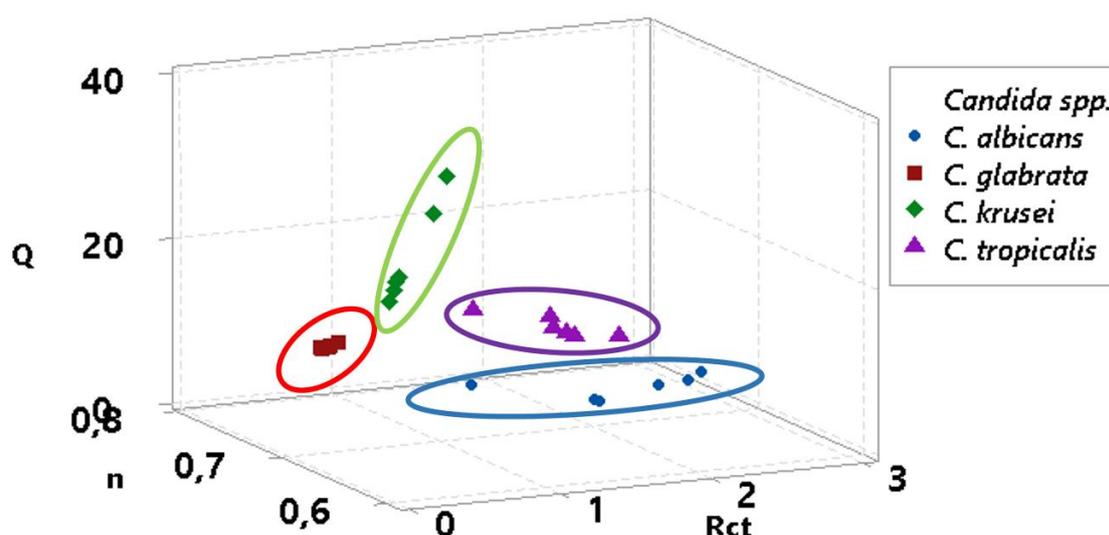
Fig. 33 $\Delta R_{ct}\%$ (a) e cobertura da superfície microbiana “ $\theta\%$ ” (b) do sistema biossensor após exposição a diferentes concentrações de cepas de *Candida*. Todos os dados experimentais usados para calcular $\Delta R_{ct}\%$ e θ são mostrados na Tabela 2.



Os dados obtidos do circuito equivalente de Randles também forneceram informações úteis relacionadas à diferenciação de *Candida spp.* após a ligação ao biossensor. Três variáveis, R_{ct} , Q e n apresentaram um valor característico para cada espécie de *Candida*. Nesse sentido, foi criado um plot 3D com esses elementos, conforme mostrado na Figura 34. Podemos observar uma distribuição efetiva dos dados no plot em função das espécies estudadas. *C. albicans* (círculos azuis) e *C.*

tropicalis (triângulos roxos) estão localizados na região de maior Rct, indicando maior efeito de bloqueio do sensor modificado por PAM e maior inserção e permeabilização desses microrganismos ao CLAV-MO. Por outro lado, *C. glabrata* está localizada em uma área de menor Rct e maiores valores de n e *C. krusei* também localizada em menor Rct, maiores valores de n. Embora esses resultados estejam correlacionados a um pequeno efeito de bloqueio, a dispersão pseudocapacitiva é maior.

Fig. 34 Gráfico 3D para os valores de n, Q e Rct mostrados na Tabela 2.



A clavanina A (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV-NH₂) é um peptídeo catiônico usado com sucesso para a detecção de bactérias (de Miranda et al., 2017; Silva Junior et al., 2018). O incremento de resíduos de aminoácidos apolares (FLPII) apresentou melhor hidrofobicidade em relação aos lipídeos. No entanto, a parede celular da maioria das leveduras compreende carboidratos relacionados ao reconhecimento imunológico, como mananos, glucanos, quitina e proteínas (Gow e Hube, 2012; Reyna-Beltrán et al., 2019), enquanto os lipídios representam um componente menor (Ruiz-Herrera et al., 2006). Nossos resultados mostram dois grupos distintos de respostas impedimétricas. *C. Albicans* e *C. tropicalis*, espécies próximas conhecidas por serem células diplóides, apresentaram respostas impedimétricas mais altas do que as espécies haplóides *C.krusei* e *C. glabrata*. Fenotipicamente, esse comportamento pode estar associado ao fato de leveduras diplóides possuírem dois conjuntos de moléculas de DNA idênticas, aumentando diretamente seu maior volume quando comparadas aos haplóides. No entanto, no nível molecular, deve-se notar que

os componentes da parede celular de leveduras diplóides são regulados para baixo, enquanto as células haplóides devem ter uma bioquímica mais dinâmica originada de suas vias de feromônio de acasalamento (Gerstein et al., 2011). Em qualquer caso, nosso biossensor eletroquímico foi capaz de discriminar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* em termos de suas características relacionadas à ploidia. A interação eletrostática foi promovida por *Candida* spp. superfície carregada negativamente com CLAV-MO catiônico que aumentou o potencial de membrana após sua permeabilização (Mishra et al., 2013). O padrão obtido no gráfico 3D permite a distinção entre as espécies de *Candida* em concentrações clinicamente relevantes. Até onde sabemos, o biossensor baseado em CLAV-MO é uma nova abordagem na discriminação de leveduras como *Candida* por meio de análises eletroquímicas. Ao todo, o evento de detecção e sua avaliação eletroquímica levaram menos de 20 minutos para serem realizados. Uma comparação do biossensor proposto com outros biossensores relatados, desenvolvidos para a identificação de *Candida* spp. com seu LOD é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 Comparação de plataformas de sensores desenvolvidas para detectar *Candida* spp. com o presente trabalho.

Sensing element	Target fungi	Detection limit (CFU mL ⁻¹)	Technique	Reference
Antibody	<i>C. albicans</i>	10 ¹	Electrochemical impedance spectroscopy (EIS)	[22]
Antibody	<i>C. albicans</i>	50	Field-effect Transistor PCR +	[23]
-	<i>C. krusei</i> <i>C. guilliermondii</i>	500	Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)	[24]
Antibody	<i>C. albicans</i>	10 ⁶	Surface Plasmon Resonance (SPR)	[25]

-	<i>C. albicans</i>	10^8	Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)	[26]
Lectin	<i>C. albicans</i>	32	UV resonance Raman spectroscopy	[27]
Antimicrobial peptide (Clavanin-MO)	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i>	2-4	Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)	This work.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O trabalho apresentou o uso de materiais biocompatíveis já conhecidos como arcabouços para cultura de células-tronco, que podem ser facilmente utilizados em aplicações de engenharia de tecidos;
- Os resultados do EIE mostraram a viabilidade e a estabilidade durante a caracterização elétrica das fibras de PVA-ConA, PVA-WGA, PVA-Chitosan, PVA-Chitosan-ConA e PVA-Chitosan-WGA eletrofiadas inoculadas com CTMs-CUH;
- As células aderidas sobre as nanofibras afetaram apenas a faixa de espectroscopia dielétrica de baixa frequência; portanto, o monitoramento pode ser realizado quando imerso em meio de cultura;
- A R_{CT} aumentou correspondentemente à quantidade de CTMs-CUH encontrada nas fibras, representando, portanto, diretamente a taxa de adesão das culturas.
- Espera-se que o sistema proposto também possa ser usado para o monitoramento não invasivo da diferenciação de CTMs-CUH.
- As nanofibras produzidas por eletrofiação, para cultura de células-tronco, apresentaram resultados satisfatórios em relação à impedância eletroquímica e viabilidade celular, porém existem perspectivas de estudos mais aprofundados a respeito de sua porosidade e arquitetura para a obtenção de uma maior compreensão de como esses arcabouços podem controlar os destinos celulares, assim como, direcionar sua diferenciação para uma linhagem desejada.
- O trabalho também demonstrou o desenvolvimento de um novo biossensor eletroquímico à base de PAM com detecção rápida e sensível de cepas de *Candida*.
- O sistema sensor baseado em nanofilmes de PTAA eletropolimerizados, $NPsTiO_2$ e o peptídeo Clavanina-MO foi capaz de detectar e discriminar quatro espécies diferentes de *Candida*, onde *Candida albicans* e *Candida tropicalis*

apresentaram a maior resposta eletroquímica analisada pela técnica impedimétrica.

- Foi alcançado um excelente limite de detecção para cada microrganismo avaliado, com 10^1 CFU mL⁻¹ e 10^6 CFU mL⁻¹ como o menor e o maior valor, respectivamente.
- A construção do biossensor tem como perspectiva principal o uso de amostras clínicas, tais como: sangue, saliva, LCR, entre outras, para uma maior validação analítica e ainda, a sua efetividade também o relaciona a possibilidades de novos experimentos, não só com fungos, mas também como outros microrganismos, como bactérias, vírus e protozoários.
- Os resultados apresentados pelo sistema sensor PTAA_NPsTiO₂_Clavanina-MO mostram seu potencial como uma possível aplicação biomédica alternativa sobre os métodos tradicionais.
- Por fim, o presente estudo possui potencial de contribuição no campo dos biossensores e da engenharia de tecidos, representando novas possibilidades bionanotecnológicas que podem futuramente ser utilizadas em aplicações na área médica e diagnóstica.

REFERÊNCIAS

- ASGHARI, F.; SAMIEI, M.; ADIBKIA, K.; AKBARZADEH, A.; DAVARAN, S. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, p.185–192, 2016.
- ALLEN, A. K.; NEUBERGER, A.; SHARON, N. The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. **Biochemical Journal**, p. 155–162, 1973.
- ALDANA, A. A.; ABRAHAM, G. A. Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 441–453, 2017.
- AO W.; KLONOSKI J.; BERLINGHOFF E.; JENSEN, J.; AFROZ, T.; MUNNS, D.; LINDSEY W.; DENYS G.; JENISONA R. Rapid detection and differentiation of clinically relevant candida species simultaneously from blood culture by use of a novel signal amplification approach, **J. Clin. Microbiol**, p. 56, 2018
- AO, C., NIU, Y., ZHANG, X., HE, X., ZHANG, W., & LU, C. Fabrication and characterization of electrospun cellulose/nano-hydroxyapatite nanofibers for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 568–573, 2017.
- ABRIGO, M.; MCARTHUR, S. L.; KINGSHOTT, P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. **Macromolecular Bioscience**, p. 772–792, 2014.
- ASTI, A; GIOGLIO, L. Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. **Int J Artif Organs**, p. 37, 2014.
- ASSIS-RIBAS, M.F.; FORNI, M.B.; WINNISCHOFER, M.; CLEIDE, M.; TROMBETTA-LIMA, Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation, **Dev Biol**, p. 63–74, 2018.
- ATALA, A. Technology Insight: applications of tissue engineering and biological substitutes in urology. **Nature Clinical Practice Urology**, p. 143–149, 2005.

ALHADLAQ, A.; MAO, J. J. Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics. **Stem Cells and Development**, p. 436–448, 2004.

ALSTEENS D.; GAUB H.; RICHARD N.; MORITZ P.; CHRISTOPH G.; DANIEL J.M. Atomic force microscopy-based characterization and design of biointerfaces. **Springer Nature**, 2017.

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 273–286, 2018.

ANDRADE, C. A. S.; NASCIMENTO, J. M.; OLIVEIRA, I. S.; DE OLIVEIRA, C. V. J.; DE MELO, C. P.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA, M. D. L. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavacin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 833–839, 2015.

ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, P. T. S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K. P.; EHRlich, H.; ... JAYAKUMAR, R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, p. 1644–1667, 2014.

ANGSTMANN, M.; BRINKMANN, I.; BIEBACK, K.; BREITKREUTZ, D.; MAERCKER, C. Monitoring human mesenchymal stromal cell differentiation by electrochemical impedance sensing. **Cytotherapy**, 2011.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, 2000.

BARKALINA, N.; CHARALAMBOUS, C.; JONES, C.; COWARD, K. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, p. 921–e938, 2014.

BAI, J.; ZHOU, B. Titanium Dioxide Nanomaterials for Sensor Applications. **Chem. Ver**, p. 10131–10176, 2014.

BEN ABDALLAH, Z.; GRAUBY-HEYWANG, C.; BEVEN, L.; CASSAGNERE, S.; MOROTÉ, F.; MAILLARD, E.; ... COHEN BOUHACINA, T. Development of an ultrasensitive label-free immunosensor for fungal aflatoxin B1 detection. **Biochemical Engineering Journal**, p.107-262, 2019.

- BARBOOTI, M. Environmental Applications of Instrumental Chemical Analysis. [s.l.] **Apple Academic Press**. p. 137–186, 2015.
- BROCK, J. Electrochemical impedance spectroscopy. **Nova Science Publishers**, 2017.
- BARNES, C. P.; SELL, S. A.; BOLAND, E. D.; SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G. L. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, p. 1413–1433, 2007.
- BARTOLD, P. M.; GRONTHOS, S.; IVANOVSKI, S.; FISHER, A.; HUTMACHER, D. W. Tissue engineered periodontal products. **Journal of Periodontal Research**, p. 1–15, 2015.
- BACAKOVA, L.; ZARUBOVA, J.; TRAVNICKOVA, M.; MUSILKOVA, J.; PAJOROVA, J.; SLEPICKA, P.; MOLITOR, M. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. **Biotechnology Advances**, p. 1111–1126, 2018.
- BAČÁKOVÁ L.; MAREŠ V.; LISÁ V.; ŠVORČÍK V. Molecular mechanisms of improved adhesion and growth of an endothelial cell line cultured on polystyrene implanted with fluorine ions. **Biomaterials**, 2000.
- BAČÁKOVÁ L.; FILOVÁ E.; RYPÁČEK F.; ŠVORČÍK V.; STARÝ V. Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering. **Physiological Research**, 2004.
- BATSALI A. K.; KASTRINAKI M.C.; PAPADAKI H.A.; PONTIKOGLOU C. Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord: Biological Properties and Emerging Clinical Applications. **Current Stem Cell Research & Therapy**, p. 144-155, 2013
- BEDIAN, L.; VILLALBA-RODRÍGUEZ, A. M.; HERNÁNDEZ-VARGAS, G.; PARRA-SALDIVAR, R.; QBAL, H. M. N. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 837–846, 2017.
- BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, p. 403–430, 2011.

BEERAVOLU N.; MCKEE C.; ALAMRI A. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. **J Vis Exp**, 2017.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, p. 325–347, 2010.

BISWARO, L. S.; DA COSTA SOUSA, M. G.; REZENDE, T. M. B.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. **Frontiers in Microbiology**, p. 9, 2018.

BHUSHAN, B. Introduction to Nanotechnology. **Springer Handbooks**, p.1–19, 2017.

CASCUDO, O.; FERNANDES, J. H. A.; SANTOS, T. O.; CARASEK, H. Contribuição à caracterização nanoestrutural de pastas de cimento por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica. **Matéria**. Rio de Janeiro, 2018.

CHAN, Y. S.; WONG, J. H.; FANG, E. F.; PAN, W.; NG, T. B. Isolation of a Glucosamine Binding Leguminous Lectin with Mitogenic Activity towards Splenocytes and Anti-Proliferative Activity towards Tumor Cells. **PLoS ONE**, p. 38961, 2012.

CHAUDHARI, A.; VIG, K.; BAGANIZI, D.; SAHU, R.; DIXIT, S.; DENNIS, V.; ... PILLAI, S. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1974, 2016.

CHEN, F.-M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, p. 86–168, 2016.

CHEN, P.; SHOU, C.; ZHENG, M.; JIANG, G.; CAO, Q.; YANG, J.; CAO, N.; XIE, T.; VELLETRI, Z.; XU, L.; ZHANG, H.; YANG, J.; HOU, Y.; WANG, Y.; SHI, F. Decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts ?, **Cell Death Differ**, P. 1128–1139, 2016.

CHEN, Y.; ZOU, C.; MASTALERZ, M.; HU, S.; GASAWAY, C.; TAO, X. Applications of Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in the Geological Sciences—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 30223–30250, 2015.

- CHEN, G.; GUO, J.; NIE, J.; MA, G. Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. **Polymer**, p. 12–19, 2016.
- CHOWDHURY, A. D.; GANGANBOINA, A. B.; PARK, E. Y.; DOONG, R. Impedimetric biosensor for detection of cancer cells employing carbohydrate targeting ability of Concanavalin A. **Biosensors and Bioelectronics**, 2018.
- CARVALHO L.A.C.; MACHINI M.T. Hemocidins derived from hemoglobin: structures, properties and perspectives. **Quimica nova**, v.36, n. 7, p.1021-1029, 2013.
- CORRÊA, J. A. F.; EVANGELISTA, A. G.; NAZARETH, T. DE M.; LUCIANO, F. B. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. **Materialia**, p. 100494, 2019.
- DA SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. S. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. **Frontiers in Microbiology**, 2014.
- DE MIRANDA, J. L.; OLIVEIRA, M. D. L.; OLIVEIRA, I. S.; FRIAS, I. A. M.; FRANCO, O. L.; ANDRADE, C. A. S. A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection. **Biochemical Engineering Journal**, p. 108–114, 2017.
- DEMETRESCU I.; PIRVU C.; MITRAN V. Effect of nano-topographical features of Ti/TiO₂ electrode surface on cell response and electrochemical stability in artificial saliva. **Bioelectrochemistry**, 2010.
- DAVIES, J. E.; WALKER, J. T.; KEATING, A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. **Stem cells Translational Medicine**, p. 1620–1630, 2017.
- DAS, P. K.; BAAJ, H.; TIGHE, S.; KRINGOS, N. Atomic force microscopy to investigate asphalt binders: a state-of-the-art review. **Road Materials and Pavement Design**, p. 693–718, 2015.
- DABAUVALLE, M.-C.; SCHULZ, B.; SCHEER, U.; PETERS, R. Inhibition of nuclear accumulation of karyophilic proteins in living cells by microinjection of the lectin wheat germ agglutinin. **Experimental Cell Research**, v. 174(1), p. 291–296, 1988.

DE LOS ANGELES, A.; FERRARI, F.; XI, R.; FUJIWARA, Y.; BENVENISTY, N.; DENG, H.; ... DALEY, G. Q. Hallmarks of pluripotency. **Nature**, v. 525(7570), p. 469–478, 2015.

DODLA, M. C.; YOUNG, A.; VENABLE, A.; HASNEEN, K.; RAO, R. R.; MACHACEK, D. W.; STICE, S. L. Differing Lectin Binding Profiles among Human Embryonic Stem Cells and Derivatives Aid in the Isolation of Neural Progenitor Cells. **PLoS ONE**, v. 6(8), p. 23266, 2011.

DVOŘÁNKOVÁ, B.; SZABO, P.; LACINA, L.; GAL, P.; UHROVA, J.; ZIMA, T.; ... SMETANA, JR.; K. Human Galectins Induce Conversion of Dermal Fibroblasts into Myofibroblasts and Production of Extracellular Matrix: Potential Application in Tissue Engineering and Wound Repair. **Cells Tissues Organs**, v. 194(6), p. 469–480, 2011.

EATEMADI, A.; DARAEI, H.; ZARGHAMI, N.; MELAT YAR, H.; AKBARZADEH, A. Nanofiber: Synthesis and biomedical applications. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 44(1), p. 111–121, 2014.

ENGEL, E.; MICHIARDI, A.; NAVARRO, M., LACROIX, D., & PLANELL, J. A. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. **Trends in Biotechnology**, v. 26(1), p. 39–47, 2008.

ETAYASH, H.; THUNDAT, T.; KAUR, K. Bacterial Detection Using Peptide-Based Platform and Impedance Spectroscopy. **Methods in Molecular Biology**, p. 113–124, 2017.

FAITA T.; SILVA V.N.; SATTIN W.R.; PINHEIRO A.O.; AMBRÓSIO C.E. Membrana amniótica: fonte alternativa de células-tronco mesenquimais em diversas espécies animais. **Pesq. Vet. Bras.** v. 36(6), p. 520-525, 2016.

FAKRUDDIN E. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. **Journal of Nanobiotechnology**, 2012.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1(1), p. 32–53, 2012.

GARCÍA-NIÑO, W. R.; ZAZUETA, C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacological Research**, v. 97, p. 84–103, 2015.

GARZON, I.; CHATO-ASTRAIN, J.; CAMPOS, F.; FERNANDEZ-VALADES, R.; SANCHEZ-MONTESINOS, I.; CAMPOS, A.; ... MARTIN-PIEDRA, M. A. Expanded differentiation capability of human Wharton's jelly stem cells. A systematic review. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 2020.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113(3), p. 236–247, 2011.

GHEORGHE M.; GUISEPPI-ELIE A. Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. **Biosens Bioelectron**, 2003.

GAO, Z.; ZHANG, L.; SUN, Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. **Journal of Controlled Release**, v.162(1), p. 45–55, 2012.

GAAZ, T.; SULONG, A.; AKHTAR, M.; KADHUM, A.; MOHAMAD, A.; AL-AMIERY, A. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. **Molecules**, p. 22833–22847, 2012.

GANTNER, F. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: The role of tumor necrosis factor-1. **Hepatology**, v. 21(1), p.190–198, 1995.

GIRÃO, A. F.; SEMITELA, Â.; RAMALHO, G.; COMPLETO, A.; MARQUES, P. A. A. P. Mimicking nature: Fabrication of 3D anisotropic electrospun polycaprolactone scaffolds for cartilage tissue engineering applications. **Composites Part B: Engineering**, v.154, p. 99–107, 2018.

GLAVAS-DODOV, M.; STEFFANSEN, B.; CRCAREVSKA, M. S.; GESKOVSKI, N.; DIMCHEVSKA, S.; KUZMANOVSKA, S.; GORACINOVA, K. Wheat germ agglutinin-functionalised crosslinked polyelectrolyte microparticles for local colon delivery of 5-FU: in vitro efficacy and in vivo gastrointestinal distribution. **Journal of Microencapsulation**, v. 30(7), p. 643–656, 2013.

GREEN, J. J.; ELISSEEFF, J. H. Mimicking biological functionality with polymers for biomedical applications. **Nature**, v. 540(7633), p. 386–394, 2016.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120(4), p. 303–311, 2018.

GHORANI, B.; TUCKER, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 227–240, 2015.

GOW, N.A.R.; HUBE, B. Importance of the candida albicans cell wall during commensalism and infection. **Curr. opin. microbiol.**v. 15, p. 406–412, 2012.

GUO M.; CHEN J.; YUN X.; CHEN K.; NIE L.; YAO S. Monitoring of cell growth and assessment of cytotoxicity using electrochemical impedance spectroscopy. **Biochim Biophys Acta - Gen Subj**, 2006.

GIAEVER I.; KEESE C.R. A morphological biosensor for mammalian cells. **Nature**, 1993.

GERSTEIN, A.C.; CLEATHERO, L.A.; MANDEGAR, M.A.; OTTO, S.P. Haploids adapt faster than diploids across a range of environments. **J. Evol. Biol.** v. 24, p. 531–540, 2011.

HULLA, J.; SAHU, S.; HAYES, A. Nanotechnology. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34(12), p. 1318–1321, 2015.

HAN, J.; MENICANIN, D.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. **Australian Dental Journal**, v. 59, p. 117–130, 2013.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I.K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

HAIDER, A. J.; JAMEEL, Z. N.; AL-HUSSAINI, I. H. M. Review on: Titanium Dioxide Applications. **Energy Procedia**, v. 157, p. 17–29, 2019.

HASHEMI, S.; MOHAMMADI, A. A.; KABIRI, H.; HASHEMPOOR, M. R.; MAHMUDI, M.; AMINI, M.; MEHRABANI, D. The healing effect of Wharton's jelly stem cells seeded on biological scaffold in chronic skin ulcers: A randomized clinical trial.

Journal of Cosmetic Dermatology, 2019.

HENDIJANI, F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. **Cell Proliferation**, v. 50(2), p. 12334, 2017.

HE, W.; BENSON, R. Polymeric Biomaterials. **Applied Plastics Engineering Handbook**, p. 145–164, 2017.

HE, C.; LIU, D.; LIN, W. Nanomedicine Applications of Hybrid Nanomaterials Built from Metal–Ligand Coordination Bonds: Nanoscale Metal–Organic Frameworks and Nanoscale Coordination Polymers. **Chemical Reviews**, v.115(19), p. 11079–11108, 2015.

HIVRALE, A.; INGALE, A. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8(12), p. 26595, 2013.

HOLAN, V.; CHUDICKOVA, M.; TROSAN, P.; SVOBODOVA, E.; KRULOVA, M.; KUBINOVA, S.; ZAJICOVA, A. Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. **Journal of Controlled Release**, v. 156(3), p. 406–412, 2011.

HOYOS-NOGUÉS, M.; GIL, F. J.; MAS-MORUNO, C. Antimicrobial Peptides: Powerful Biorecognition Elements to Detect Bacteria in Biosensing Technologies. **Molecules**, v. 23(7), p. 1683, 2018.

HUANG, K.-J.; LI, J.; WU, Y.-Y.; LIU, Y.-M. Amperometric immunobiosensor for α -fetoprotein using Au nanoparticles/chitosan/TiO₂–graphene composite based platform. **Bioelectrochemistry**, v. 90, p. 18–23, 2013.

HU, F.; GAO, X.; SHE, R.; CHEN, J.; MAO, J.; XIAO, P.; SHI, R. Effects of antimicrobial peptides on growth performance and small intestinal function in broilers under chronic heat stress. **Poultry Science**, p. 379, 2016.

- HU, X.; LIU, S., ZHOU, G.; HUANG, Y.; XIE, Z.; JING, X. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p.12–21, 2014.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B. N.; REINHARDT, R. L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C. D.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; VERFAILLIE, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41–49, 2002.
- JIANG X.; TAN L.; ZHANG B.; ZHANG Y.; TANG H.; XIE Q. Detection of adherent cells using electrochemical impedance spectroscopy based on molecular recognition of integrin $\beta 1$. **Sensors Actuators, B Chem**, 2010.
- KEIROUZ, A.; FORTUNATO, G.; ZHANG, M.; CALLANAN, A.; RADACSI, N. Nozzle-free electrospinning of Polyvinylpyrrolidone/Poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds for skin tissue engineering applications. **Medical Engineering & Physics**, 2019.
- KANIMOZHI, K.; KHALEELBASHA, S.; SUGANTHAKUMARI, V. Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering. **Materials Science and Engineering**, v. 61, p. 484–491, 2016.
- KAZARIAN, S. G.; CHAN, K. L. A. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.7, p. 858–867, 2006.
- KAUR, H. Chakrabarti, Strategies to Reduce Mortality in Adult and Neonatal Candidemia in Developing Countries, **J. Fungi**. p. 41, 2017.
- KANG, H. K.; LEE, H. H.; SEO, C. H.; PARK, Y. Antimicrobial and Immunomodulatory Properties and Applications of Marine-Derived Proteins and Peptides. **Marine Drugs**, v. 17, p. 350, 2019.
- KEANE, T. J.; BADYLAK, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, p.112–118, 2014.
- KEYMANESH, K.; SOLTANI, S.; SARDARI, S. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25,p. 933–944, 2009.

KRIVOROTOVA, T.; CIRKOVAS, A.; MACIULYTE, S.; STANEVICIENE, R.; BUDRIENE, S.; SERVIENE, E.; SEREIKAITI, J. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 49–56, 2016.

KIM, T.; LEE, H.; KIM, Y.; NAM, J.-M.; LEE, M. Protein-coated nanofibers for promotion of T cell activity. **Chemical Communications**, v. 49, p. 3949, 2013.

KIM, Y. S.; KONG, W. H.; KIM, H.; HAHN, S. K. Targeted systemic mesenchymal stem cell delivery using hyaluronate – wheat germ agglutinin conjugate. **Biomaterials**, 2016.

KISHAN, A. P.; COSGRIFF-HERNANDEZ, E. M. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 10, p. 2892–2905, 2017.

KHORSHIDI, S.; SOLOUK, A.; MIRZADEH, H.; MAZINANI, S.; LAGARON, J. M.; SHARIFI, S., & RAMAKRISHNA, S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, p. 715–738, 2015.

KHAN, F. A. Applications of Nanomaterials in Human Health, 2020.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

KUMAR, A.; HAN, S. S. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, p.159–182, 2016.

KUMAR, V.; NAQVI, S.; GOPINATH, P. Applications of Nanofibers in Tissue Engineering. **Applications of Nanomaterials**, p.179–203, 2018.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 6, p. 95505, 2018.

KARIMI, A.; NAVIDBAKHSH, M. Mechanical properties of PVA material for tissue engineering applications. **Materials Technology**, v. 29, p. 90–100, 2013.

LASS-FLÖRL, C. Current Challenges in the Diagnosis of Fungal Infections, in: T. Lion (Ed.), Hum. Fungal Pathog. Identification, **Humana Press**, p. 3–17, 2017.

LASIA, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. Canadá: **Springer**, 2014. *E-book*.

LANGE R.; LÜTHEN F.; BECK U.; RYCHLY J.; BAUMANN A.; NEBE B. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. **Biomolecular Engineering**, 2002.

LEDESMA-MARTÍNEZ, E.; MENDOZA-NÚÑEZ, V. M.; SANTIAGO-OSORIO, E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. **Stem Cells International**, p. 1–12, 2016.

LEE JW.; KIM YH.; PARK KD.; JEE KS.; SHIN JW.; HAHN S.B. Importance of integrin β 1-mediated cell adhesion on biodegradable polymers under serum depletion in mesenchymal stem cells and chondrocytes. **Biomaterials**, 2004.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 5, p. 1555–1567, 2008.

LI, W.; YU, J.; XU, H.; BAO, J. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 2, p. 282–286, 2011.

LI, T.; XIA, M.; GAO, Y.; CHEN, Y.; XU, Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 15, p. 1293–1306, 2015.

LIN, S. S.; LEVITAN, I. B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. **Trends Neuroscience**, v.14, n.7, p.273–277, 1991.

LIN, Y.-T.; CHEN, J.-S.; WU, M.-H.; HSIEH, I.-S.; LIANG, C.-H.; HSU, C.-L.; CHEN, Y.-L. Galectin-1 Accelerates Wound Healing by Regulating the Neuropilin-1/Smad3/NOX4 Pathway and ROS Production in Myofibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**, v.135, n. 1, p. 258–268, 2015.

LIU, S.; JIA, Y.; YUAN, M.; GUO, W.; HUANG, J.; ZHAO, B.; GUO, Q. Repair of Osteochondral Defects Using Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model. **BioMed Research International**, p. 1–12, 2017.

LIU, X.; MARRAKCHI, M.; XU, D.; DONG, H.; ANDREESCU, S. Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 9–16, 2016.

LEE J.; PARK Y. Mechanism of Action of Antimicrobial Peptides Against Bacterial Membrane. **J Bacteriol Virol**, v. 44, n. 2, p. 140-151, 2014.

LEE, Y.C.; MOON, J.Y. Introduction to Bionanotechnology, 2020.

LI, L.; JONG T. Electrospun Polyvinylidene Fluoride-Based Fibrous Scaffolds with Piezoelectric Characteristics for Bone and Neural Tissue Engineering. **Nanomaterials**, v. 9, n. 7, p. 952, 2019.

LI, K.; QIAN, J.; WANG, P.; WANG, C.; FAN, X.; LU, B.; GUO, W. Toxicity of three crystalline TiO₂ nanoparticles in activated sludge: Bacterial cell death modes differentially weaken sludge dewaterability. **Environmental Science & Technology**, 2019.

LAGUNES, L.; RELLO, J., Invasive candidiasis: From mycobiome to infection, therapy, and prevention, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v. 35, p.1221–1226, 2016.

LOW K.; WONG LY.; MALDONADO M.; MANJUNATH C.; HORNER C.B.; PEREZ M. Physico-electrochemical Characterization of Pluripotent Stem Cells during Self-Renewal or Differentiation by a Multi-modal Monitoring System. **Stem Cell Reports**, 2017.

MA, X.; LIU, J.; ZHU, W.; TANG, M.; LAWRENCE, N.; YU, C.; CHEN, S. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018.

MANDAL, S. M.; KHAN, J.; MAHATA, D.; SAHA, S.; SENGUPTA, J.; SILVA, O. N.; ... FRANCO, O. L. A self-assembled clavanin A-coated amniotic membrane scaffold for the prevention of biofilm formation by ocular surface fungal pathogens.

Biofouling, v. 33, n. 10, p. 881–891, 2017.

MALVANO, F.; PILLOTON, R.; ALBANESE, D. A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide Nisin for the detection of *Salmonella* spp. **Food Chemistry**, v. 12, n. 68, p. 68, 2020.

MATHELIÉ-GUINLET, M.; COHEN-BOUHACINA, T.; GAMMOUDI, I.; MARTIN, A.; BÉVEN, L.; DELVILLE, M.-H.; GRAUBY-HEYWANG, C. Silica nanoparticles-assisted electrochemical biosensor for the rapid, sensitive and specific detection of *Escherichia coli*. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2019.

MEHBUB, M.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives. **Marine Drugs**, v. 12, n. 8, p. 4539–4577, 2014.

MADURAVEERAN, G.; M. SASIDHARAN, V. G. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications, *Biosens.* **Bioelectron**, v.103, p.113–129, 2018.

MACHADO, R. N.; LETA J. Crescimento, autores e temáticas da produção na área de células-tronco: o caso dos BRICS. **XVIII Encontro Nacional de Pesquisa em Ciência da Informação (XVII ENANCIB)**, 2017.

MAHLA, R. S. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. **International Journal of Cell Biology**, p. 1–24, 2016.

MARRESE, M.; GUARINO, V.; AMBROSIO, L. Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 8, n. 1, p. 7, 2017.

MIKKOLA, M.; TOIVONEN, S.; TAMMINEN, K.; ALFTHAN, K.; TUURI, T.; SATOMAA, T.; ... OTONKOSKI, T. Lectin from *Erythrina cristagalli* Supports Undifferentiated Growth and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 5, p. 707–716, 2013.

MOLAEI N.; MOSAYEBI G.; PISHDADIAN A.; EJTEHADIFAR M.; GANJI A.
Evaluating the Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using
MTT Assay. **Int J Basic Sci Med**, v.2, n.1, p. 25-28, 2017.

MURATA, M.; YONAMINE, T.; TANAKA, S.; TAHARA, K.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI,
H. Surface Modification of Liposomes Using Polymer-Wheat Germ Agglutinin
Conjugates to Improve the Absorption of Peptide Drugs by Pulmonary
Administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.102, n. 4, p.1281–1289,
2013.

MUSIALEK, P.; MAZUREK, A.; JAROCHA, D.; TEKIELI, L.; SZOT, W.;
KOSTKIEWICZ, M.; MAJKA, M. Myocardial regeneration strategy using Wharton's
jelly mesenchymal stem cells as an off-the-shelf "unlimited" therapeutic agent: results
from the Acute Myocardial Infarction First-in-Man Study. **Advances in Interventional
Cardiology**, v. 2, p.100–107, 2015.

MCNAMARA, K.; TOFAIL, S. A. M. Nanoparticles in biomedical applications.
Advances in Physics, v. 2, n.1, p. 54–88, 2016.

MORETTO L. M.; KALCHER K. Environmental Analysis by Electrochemical Sensors
and Biosensors: Fundamentals. **Springer-Verlag New York**, 2014.

MISHRA, B.; LEISHANGTHEM, G.D.; GILL, K.; SINGH, A.K.; DAS, S.; SINGH, K.;
XESS, I.; DINDA, A.; KAPIL, A.; PATRO, I.K.; DEY, S. A novel antimicrobial peptide
derived from modified N-terminal domain of bovine lactoferrin: Design, synthesis,
activity against multidrug-resistant bacteria and Candida. **Biochim. Biophys. Acta –
Biomembr**, v. 18, n. 28, p. 677–686, 2013.

NAJAR, M.; CROMPOT, E.; VAN GRUNSVEN, L. A.; DOLLÉ, L.; LAGNEAUX,
L. Aldehyde dehydrogenase activity of Wharton jelly mesenchymal stromal cells:
isolation and characterization. **Cytotechnology**, 2019.

NEREM, R. M. Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future. **Tissue
Engineering**, v. 12, n. 5, p. 1143–1150, 2006.

NASCIMENTO, K. S.; CUNHA, A. I.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. An overview of lectins purification strategies. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n.11, p. 527–541, 2012.

NISHIMURA, H.; NISHIMURA, M.; ODA, R.; YAMANAKA, K.; MATSUBARA, T.; OZAKI, Y.; KATO, Y. Lectins induce resistance to proteases and/or mechanical stimulus in all examined cells—including bone marrow mesenchymal stem cells—on various scaffolds. **Experimental Cell Research**, v. 295, n.1, p.119–127, 2004.

NORDSTRÖM, R.; MALMSTEN, M. Delivery systems for antimicrobial peptides. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 242, p.17–34, 2017.

NGUYEN, L.T.; HANEY, E.F.; VOGEL, H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol**, v. 29, p. 464–472, 2011.

NGUYEN, H.; LEE, S.; LEE, U.; FERMIN, C.; KIM, M. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. **Materials**, v.12, n.1, p. 121, 2019.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 728–732, 2009.

PAPPAS, M.S.; LIONAKIS, M.C.; ARENDRUP, L.; OSTROSKY-ZEICHNER, B.J.K. Invasive Candidiasis, **Nat. Rev. Dis**, 2018.

PATI, F.; JANG, J.; HA, D.-H.; WON KIM, S.; RHIE, J.-W.; SHIM, J.-H.; CHO, D.W. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nature Communications**, v. 5, n.1, 2014.

PRÄBST, K.; ENGELHARDT, H.; RINGGELER, S.; HÜBNER, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. **Cell Viability Assays**, p. 1–17, 2017.

PACHECO, W. F. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PATRA, P.; MITRA, S.; DEBNATH, N.; PRAMANIK, P.; GOSWAMI, A. Ciprofloxacin

conjugated zinc oxide nanoparticle: A camouflage towards multidrug resistant bacteria. **Bulletin of Materials Science**, v. 37, n. 2, p. 199–206, 2014.

PALEČEK, E.; TKÁČ, J.; BARTOŠÍK, M.; BERTÓK, T.; OSTATNÁ, V.; PALEČEK, J. Electrochemistry of Nonconjugated Proteins and Glycoproteins. Toward Sensors for Biomedicine and Glycomics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 5, p. 2045–2108, 2015.

PÉAULT, B.; ASATRIAN, G.; PHAM, D.; HARDY, W. R.; JAMES, A. W. Stem cell technology for bone regeneration: current status and potential applications. *Stem Cells and Cloning*: **Advances and Applications**, p. 39, 2015.

PRASAD, R. (Ed.). Fungal Nanotechnology. **Fungal Biology**, 2017.

PRICKRIL B. & RASOOLY A. Biosensors and Biodetection Methods and Protocols. Volume 2: **Electrochemical, Bioelectronic, Piezoelectric, Cellular and Molecular Biosensors**. Second Edition. Ed. Humana Press, 2017.

PORTILLO-TÉLLEZ, M.; DEL C.; BELLO, M.; SALCEDO, G.; GUTIÉRREZ, G.; GÓMEZ-VIDALES, V., & GARCÍA-HERNÁNDEZ, E. Folding and Homodimerization of Wheat Germ Agglutinin. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 6, p. 1423–1431, 2011.

QIAO, Z.; FU, Y.; LEI, C.; LI, Y. Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review. **Food Control**, v. 10, n. 71, p. 11-16, 2020.

REYNA-BELTRÁN, E.; MÉNDEZ, C.I.B.; IRANZO, M.; MORMENEO, S.; LUNA-ARIAS, J.P. The Cell Wall of *Candida albicans*: A Proteomics View, in: Sandai, D. (Ed.), *Candida Albicans*. **InTech Open**, p. 71–92, 2019.

RIBEIRO, K. L.; FRÍAS, I. A. M.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; SOUSA-JUNIOR, A. A.; SILVA, O. N.; ANDRADE, C. A. S. Clavanin A-bioconjugated Fe₃O₄/Silane core-shell nanoparticles for thermal ablation of bacterial biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.169, p. 72–81, 2018.

ROBLES-GARCÍA, M. A.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, F.; MÁRQUEZ-RÍOS, E.; AGUILAR, J. A.; BARRERA-RODRÍGUEZ, A.; AGUILAR, J.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C.

L. Applications of Nanotechnology in the Agriculture, Food, and Pharmaceuticals.

Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 16, n. 8, p. 8188–8207, 2016.

RAZZAQ R.; SHAHID M.; NASIR B.A.; WAQAS M. Fabrication of nanomaterials using nanotechnology and biotechnology. **Biomedical Letters**, v. 6, n.1, p. 68-75, 2020

RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, M.; VEGA-RUIZ, B.; RAMOS-ZÚÑIGA, R.; SALDAÑA-KOPPEL, D. A.; QUIÑONES-OLVERA, L. F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed Research International**, p. 1–15, 2015.

ROGOVINA, S. Z. Biodegradable polymer composites based on synthetic and natural polymers of various classes. **Polymer Science Series C**, v. 58, n. 1, p. 62–73, 2016.

ROY, R.; SHIAO, T. C.; RITTENHOUSE-OLSON, K. Glycodendrimers: versatile tools for nanotechnology. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 85–108, 2013.

RUARDY T. G.; SCHAKENRAAD J. M.; VAN DER MEI H.C.; BUSSCHER H.J. Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces. **j biomed mater res**, 1995.

RUIZ-HERRERA, J.; VICTORIA ELORZA, M.; VALENTÍN, E.; SENTANDREU, R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Res**, v. 6, p. 14–29, 2006.

SÁNCHEZ-NAVARRO, M.; MUÑOZ, A.; ILLESCAS, B. M.; ROJO, J.; MARTÍN, N. Fullerene as Multivalent Scaffold: Efficient Molecular Recognition of Globular Glycofullerenes by Concanavalin A. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 3, p. 766–769.

SAUCEDO, N. M.; SRINIVES, S.; MULCHANDANI, A. Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of Viable Bacteria and Antibiotic Screening. **Journal of Analysis and Testing**, 2019.

SANDRI, G.; ROSSI, S.; BONFERONI, M. C.; CARAMELLA, C.; FERRARI, F. Electrospinning Technologies in Wound Dressing Applications. **Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications**, p. 315–336, 2020.

SACHLOS E.; CZERNUSZKA J. T.; GOGOLEWSKI S.; DALBY M. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, 2003.

SANDHYARANI, N. Surface modification methods for electrochemical biosensors. **Electrochemical Biosensors**, p. 45–75, 2019.

SILVA JUNIOR, A. G.; OLIVEIRA, M. D. L.; OLIVEIRA, I. S.; LIMA-NETO, R. G.; SÁ, S. R.; FRANCO, O. L.; ANDRADE, C. A. S. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.

SURYAVANSHI, A.; KHANNA, K.; SINDHU, K. R.; BELLARE, J.; SRIVASTAVA, R. Magnesium oxide nanoparticle-loaded polycaprolactone composite electrospun fiber scaffolds for bone–soft tissue engineering applications: in-vitro and in-vivo evaluation. **Biomedical Materials**, v. 12, n. 5, p. 5-11, 2017.

STEFAŃSKA, K.; OŻEGOWSKA, K.; HUTCHINGS, G.; POPIS, M.; MONCRIEFF, L.; DOMPE, C.; NOWICKI, M. Human Wharton's Jelly—Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1102, 2020.

SAITO, Y.; KIKUCHI, T. Voltammetry: Theory, Types e applications. **Nova Science Pub Inc**, 2013.

SELL, S. A.; WOLFE, P. S.; GARG, K.; MCCOOL, J. M.; RODRIGUEZ, I. A.; BOWLIN, G. L. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 522–553, 2010.

SILVA, R. R.; AVELINO, K. Y. P. S.; RIBEIRO, K. L.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S. Optical and dielectric sensors based on antimicrobial peptides for microorganism diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, 2014.

SILVA, O. N.; FENSTERSEIFER, I. C. M.; RODRIGUES, E. A.; HOLANDA, H. H. S.; NOVAES, N. R. F.; CUNHA, J. P. A.; FRANCO, O. L. Clavanin A Improves Outcome of Complications from Different Bacterial Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1620–1626, 2014.

SILVA, O. N.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANEY, E. F.; FENSTERSEIFER, I. C. M.; RIBEIRO, S. M.; PORTO, W. F.; FRANCO, O. L. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

SMITH, B.C. Fundamentals of Fourier Infrared Spectroscopy, 2nd ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group: **Boca Raton**, FL, USA, 2011.

SINGH, R.; DAS MUKHERJEE, M.; SUMANA, R.K.; GUPTA, S.; SOOD, B.D. Malhotra, Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis Sensors Actuators. **B Chem**, p. 385–404, 2014.

SINGH, M.; KASPER, F.K.; MIKOS A.G. Tissue Engineering Scaffolds, 2013.

SCHMIDTCHEN A.; PASUPULETI M.; MALMSTEN M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 265–274, 2014.

SHABAFROOZ, V.; MOZAFARI, M.; VASHAEE, D.; TAYEBI, L. Electrospun Nanofibers: From Filtration Membranes to Highly Specialized Tissue Engineering Scaffolds. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n.1, p. 522–534, 2014.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science**, 36(9), 1254–1276, 2011.

SCHIFFMAN, J. D.; SCHAUER, C. L. A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. **Polymer Reviews**, v. 48, n. 2, p. 317–352, 2008.

SHETTI, N. P.; NAYAK, D. S.; MALODE, S. J.; KULKARNI, R. M. Electrochemical Sensor Based upon Ruthenium Doped TiO₂ Nanoparticles for the Determination of

Flufenamic Acid. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 164, n. 5, p. 3036–3042, 2016.

SHETTI, N.P.; BUKKITGAR, S.D.; REDDY, K.R.; REDDY, C.V.; AMINABHAVI, T.M. Nanostructured titanium oxide hybrids-based electrochemical biosensors for healthcare applications. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 178, p. 385–394, 2019.

SHI, X.; ZHANG, X.; YAO, Q.; HE, F. A novel method for the rapid detection of microbes in blood using pleurocidin antimicrobial peptide functionalized piezoelectric sensor. **Journal of Microbiological Methods**, v. 133, p. 69–75, 2017.

SUNDARAMURTHI, D.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Polymer Reviews**, 54(2), 348–376, 2014.

SUBBIAH, T.; BHAT, G. S.; TOCK, R. W.; PARAMESWARAN, S.; RAMKUMAR, S. S. Electrospinning of nanofibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, n. 2, p. 557–569, 2005.

SCHÄFER-KORTING, M.; ROLFF, J. Skin delivery of antimicrobial peptides. **Emerging Nanotechnologies in Immunology**, p. 23–45, 2018.

SULLIVAN, D. J.; CRUZ-ROMERO, M.; COLLINS, T.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P.; MORRIS, M. A. Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 83, n. 355–364, 2018.

STODDART, M. J. Cell Viability Assays: Introduction. **Mammalian Cell Viability**, p. 1–6, 2011.

THENMOZHI, S.; DHARMARAJ, N.; KADIRVELU, K.; KIM, H. Y. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 217, p. 36–48, 2017.

TOEGEL, S.; HARRER, N.; PLATTNER, V. E.; UNGER, F. M., VIERNSTEIN, H., GOLDRING, M. B., ... WIRTH, M. Lectin binding studies on C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes provide a basis for new tissue engineering and drug delivery

perspectives in cartilage research. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 1, 121–129, 2007.

TOEGEL, S.; BIEDER, D.; ANDRÉ, S.; ALTMANN, F.; WALZER, S. M.; KALTNER, H.; GABIUS, H. J. Glycophenotyping of osteoarthritic cartilage and chondrocytes by RT-qPCR, mass spectrometry, histochemistry with plant/human lectins and lectin localization with a glycoprotein. **Arthritis Research & Therapy**, v. 15, n. 5, p. 147, 2013.

TSAI P. C.; FU T. W.; CHEN Y. M. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. **Liver Transpl**, v. 15, p. 484–495, 2009.

TEUSCHL, A. H.; NEUTSCH, L.; MONFORTE, X.; RÜNZLER, D.; VAN GRIENSVEN, M.; GABOR, F.; REDL, H. Enhanced cell adhesion on silk fibroin via lectin surface modification. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 6, p. 2506–2517, 2014.

UYAR, T.; KNY E. Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications. Research, Design and Commercialization. **Woodhead Publishing**, 2017.

VAN'T HOF W.; VEERMAN E.; HELMERHORST E.J.; AMERONGEN A.V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. **Biological Chemistry**, p. 597–619, 2001.

VAN KAN E.J.M.; DEMEL R. A. The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. **Biochimica end Biophysica Acta**, p. 84–92, 2003.

VEDADGHAVAMI, A.; MINOOEI, F.; MOHAMMADI, M. H.; KHETANI, S.; REZAEI KOLAHCHI, A.; MASHAYEKHAN, S.; SANATI-NEZHAD, A. Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 62, p. 42–63, 2017.

VAREJÃO, N.; ALMEIDA, M.; DA S., DE CICCO, N. N. T.; ATELLA, G. C.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds

(CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 9, p. 1917–1924, 2010.

VIEIRA PALADINO, F.; DE MORAES RODRIGUES, J. DA SILVA, A.; GOLDBERG, A. C. The Immunomodulatory Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Stem Cells International**, p. 1–7, 2019.

VOIGTLÄNDER, B. Scanning Probe Microscopy. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2015. *Ebook*.

WRIGHT, C. S. The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 111, n. 4, p. 439–457, 1977.

WANG, H.-S.; HUNG, S.-C.; PENG, S.-T.; HUANG, C.-C.; WEI, H.-M.; GUO, Y.-J.; CHEN, C.-C. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, 2004.

WANG, Y.-C.; KAO, S.-H.; HSIEH, H.-J. A Chemical Surface Modification of Chitosan by Glycoconjugates To Enhance the Cell–Biomaterial Interaction. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, p. 224–231, 2003.

WANG, S.; ZENG, X.; YANG, Q.; QIAO, S. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 603, 2016. .

WAN, A. C. A.; TAI, B. C. U. CHITIN — A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1776–1785, 2013.

WILSON, D.; MATERÓN, E.; IBÁÑEZ-REDÍN, G.; FARIA, R. C.; CORREA, D. S.; OLIVEIRA, O. N. Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides. **Talanta**, 2018.

XU, X.; WEI, H.; DONG, Z.; CHEN, Y.; TIAN, Z. The differential effects of low dose and high dose concanavalin A on cytokine profile and their importance in liver injury. **Inflammation**, v.55, n.4, p.144–152, 2006.

XUE, J.; WU, T.; DAI, Y.; XIA, Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 8, p. 5298–5415, 2019.

XUE, J.; XIE, J.; LIU, W.; XIA, Y. Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 50, n. 8, p. 1976–1987, 2017.

YANG, H.; LI, Z.; SHAN, M.; LI, C.; QI, H.; GAO, Q.; ZHANG, C. Electrogenerated chemiluminescence biosensing for the detection of prostate PC-3 cancer cells incorporating antibody as capture probe and ruthenium complex-labelled wheat germ agglutinin as signal probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 863, p. 1–8, 2015.

YANG, Y.; CHAWLA, A.; ZHANG, J.; ESA, A.; JANG, H. L.; KHADEMHOSEINI, A. Applications of Nanotechnology for Regenerative Medicine; Healing Tissues at the Nanoscale. **Principles of Regenerative Medicine**, 485–504, 2019.

YU, X.; PISHKO, M. V. Nanoparticle-Based Biocompatible and Targeted Drug Delivery: Characterization and in Vitro Studies. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3205–3212, 2011.

YOON, J. H.; ROH, E. Y.; SHIN, S.; JUNG, N. H.; SONG, E. Y.; CHANG, J. Y.; JEON, H. W. Comparison of Explant-Derived and Enzymatic Digestion-Derived MSCs and the Growth Factors from Wharton's Jelly. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2013.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C.; NG, T. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 3791–3810, 2015.

ZANGHELINI, F.; FRÍAS, I. A. M.; RÉGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; SACILLOTI, M.; OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S. Biosensing breast cancer cells based on a three-dimensional TIO 2 nanomembrane transducer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 313–320, 2017.

ZHA, F.; CHEN, W.; ZHANG, L.; YU, D. Electrospun natural polymer and its composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, p. 1–30, 2019.

ZHOU, C.; ZOU, H.; LI, M.; SUN, C.; REN, D.; LI, Y. Fiber optic surface plasmon resonance sensor for detection of E. coli O157:H7 based on antimicrobial peptides and AgNPs-rGO. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 117, p. 347–353, 2018.

APÊNDICE A– ARTIGO PUBLICADO NO BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL.

Biochemical Engineering Journal 167 (2021) 107918



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej



IMPEDIMETRIC CLAVMO PEPTIDE-BASED SENSOR DIFFERENTIATES PLOIDY OF CANDIDA SPECIES

Kalline L. Ribeiro^a, Isaac A.M. Frías^{a,b}, Alberto G. Silva Júnior^a, Reginaldo G. Lima-Neto^c, Sandra R. Sá^b, Octávio L. Franco^{d,e}, Maria D.L. Oliveira^{a,b}, Cesar A.S. Andrade^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^c Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^d Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas de Brasília, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

^e S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Candida sp.
 Nanoparticles
 Impedance spectroscopy
 Antimicrobial peptide
 CLAVMO

ABSTRACT

Yeast biotechnologies are a cornerstone to modern lifestyle in all spheres of society, as their products are essential for the economy and industrial activities. The life cycle of many yeasts such as *Candida* alternates between diplophase and haplophase. Both ploidies can exist as stable cultures; however, it has been shown that wild haploid yeast efficiently cross in poor environments, whereas wild diploid species hybridize predominantly in rich nutrient surroundings. Some *Candida* species have had their ploidy engineered to produce various important biomolecules useful to the detergent, food, pharmaceutical and other industries. Several works show that MALDI-TOF MS has become an ideal platform for ploidy analysis. Recent reports have shown that antimicrobial peptides (AMP) present enhanced hydrophobic interaction towards cell membranes. In this work, the authors explored a modified AMP named Clavanin A (CLAVMO) as an unprecedented bioreceptor capable of differentiating the molecular composition of the cell wall of *Candida* spp. A thin film of poly(3-thiophene acetic acid) (PTAA) was electropolymerized to avail the covalent immobilization of amino-functionalized titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) whose electrochemical properties are excellent to provide a discernable redox response. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the biosensor assembly and the biorecognition process. Additionally, MALDI-TOF was employed to confirm ploidy of *Candida* strains used in this work. Our results suggest that TiO₂NPs-CLAVMO biosensor is a suitable biological probe that can be used to detect and differentiate *Candida* species based on their ploidy. For instance, *C. Albicans* and *C. tropicalis*, which are close related species known for being diploid presented higher impedimetric response than haploid species *C.krusei* and *C. glabrata*. The proposed biosensor stands out as a useful alternative for highly sensitive differentiation of *Candida* yeast cells, without the intricacies of MALDI-TOF sample preparation. The biotetection event and its electrochemical evaluation took less than 20 min to perform. The platform showed stability for over a week, a linear detection range between 10¹-10⁶ CFU mL⁻¹ and limits of detection (LODs) between 2 and 3 CFU mL⁻¹.

1. Introduction

Yeasts are eukaryotic microorganisms with essential roles in nature and important biotechnological applications to produce food (fast dough raising, organic acid resistance, rehydration tolerance), beverage (ethanol tolerance, fermentation capacity, absence of off-flavors), and antibiotics [1]. Some yeasts are considered obligated diploids and others

are known to revert their karyotype between haploidy and diploidy in response to nutrient limitation or other environmental stresses [2,3]. Moreover, some *Candida* yeasts have had their ploidy engineered to display important industrial properties [4]. Since the 2000s, MALDI-TOF MS has become an ideal platform for genomics and proteomics analysis. Generated spectra are analyzed as a fingerprint where ribosomal proteins appear with exact molecular mass ranging from 2,

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.
 E-mail address: csrandrade@gmail.com (C.A.S. Andrade).

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107918>

Received 14 August 2020; Received in revised form 22 December 2020; Accepted 25 December 2020

Available online 31 December 2020

1369-703X/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

000 to 20,000 Da, which is advantageous because they may be efficiently employed as biomarkers [5]. Several works show that ploidy induction on the proteome of vegetables presents considerably pronounced effects. However, to the best of our knowledge, only one research applied MALDI-TOF MS to characterize hybridization successfully in haploids yeasts [6]. MALDI-TOF sample preparation is expensive and complicated [7]. Therefore, biosensor devices emerge as an innovative alternative due to their low cost, portability, miniaturization capability, and enhanced sensitivity associated with the use of nanostructured components [8]. Thus, the biosensor device could be favorably employed for ploidy characterization.

Antimicrobial peptides (AMP) are known for their binding and lytic properties by their ability to create pores in cell membranes. This mechanism of action has been applied in biosensors for bacterial detection for the last 15 years. Some AMPs have been reported to present single species selectivity depending on its amino acid sequence while others are Gram-type specific or even broad-spectrum active. Therefore, new or modified AMPs can be designed for enhanced interaction [9]. Clavanin A is one of the amphipathic AMPs isolated from the hemocytes of *Styela clava*, a marine organism. Clavanins have demonstrated antifungal properties, causing rapid dissipation of *C. albicans* transmembrane potential [10].

Moreover, one of the authors demonstrated that the addition of five non-polar amino acid residues (FLPII) to Clavanin A optimized its strong affinity towards lipid bilayers [11]. The interaction mechanism relies on its natural activity to attach to lipidic molecules in the membrane. Thus, in the present study, we explored the use of CLAVMO as a probe to detect and differentiate *Candida* yeasts. *Candida* virulence is associated with the particularities of its cell wall, which is dynamic and responds to its genetics and adaptation. The main components of *Candida* cell wall are chitin, β -glucan, mannoproteins [12] and enzymes, some of which have been aimed in previous works as indirect targets for lipopeptide antimycotics [13]. However, an unmistakable phenotypic differentiation can be found in relation to haploids and diploids yeasts membrane [14]. In this context, we designed a biosensing platform where CLAVMO bioactivity was preserved by its covalent immobilization to an inorganic platform constructed from a self-assembled monolayer of poly(thiophene acetic acid) (PTAA) and amino-functionalized TiO₂ nanoparticles (NH₂-TiO₂NPs) for detection and differentiation of the following pathogenic *Candida* species: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*. TiO₂ crystalline anatase nanoparticles provide excellent electrochemical performance emerging from the large accessibility to both bulk and surface properties [15]. The objective of this study is to identify yeasts species (or varieties) and identify whether these yeasts are being found at its haploid or diploid state. The biosensing properties we are availing in this study are, i) the membrane lipid composition and physico-chemical characteristics of each yeast strain (this includes surface proteins, carbohydrate moieties, etc) and ii) the actual size of yeasts, being that diploid yeast are larger than haploid ones. Therefore, the performance of the biosensor was assessed during the construction of the platform and during the biorecognition process by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), to explore the changes of the impedimetric transducer response and complementarily, by atomic force microscopy (AFM) to spot changes on the surface of the biosensor. Additionally, MALDI-TOF was employed to confirm ploidy of *Candida* strains used in this research (spectra shown in supplementary information).

2. Experimental

2.1. Materials

3-Thiopheneacetic acid (TAA), (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES), titanium dioxide nanoparticles (TiO₂), N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,

USA). Potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆]) and potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]) were obtained from Dinamica (São Paulo, SP, Brazil). High-purity water was obtained from a Millipore Milli-Q plus (Billerica, USA). All other chemicals were analytical-grade quality and used as received. *Candida* yeasts were cultured at 37 °C in Sabouraud Dextrose Agar with chloramphenicol. All samples were taken from cultures at the exponential phase when reaching 10⁶ CFU mL⁻¹.

2.2. Amination of TiO₂NPs

Chemical modification of 0.5 g TiO₂NPs was performed in a round bottom flask with 50 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). The solution was set in an ultrasonic bath for 1 h, and after dispersion, 400 μ L of APTES were injected; the solution was stirred overnight. Finally, modified nanoparticles were washed in methanol, filtered and dried in an oven at 60 °C.

2.3. CLAVMO synthesis

CLAVMO was synthesized using the solid phase with N-9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) strategy. The peptide was then purified by high-performance liquid chromatography (HPLC), obtaining a purity higher than 95%.

2.4. Atomic force microscopy and MALDI-TOF analyses

The surface of the biosensor was analyzed through a SPM-9700 atomic force microscope (Shimadzu Corporation, Japan) using silicon probe cantilevers (Nanoworld, Japan, 300 kHz resonant frequency, 3 N m⁻¹ spring force constant) in noncontact mode (24 °C \pm 1 °C). The images were set to 512 \times 512 pixels with a scan area of 5 \times 5 μ m and analyzed with Gwyddion software.

MALDI-TOF spectra of *Candida* yeasts were obtained according to [7] and all analyses were performed in duplicate. One single colony from each yeast was directly deposited in a 196-position target plate (Bruker Daltonik GmbH). Aliquots of 1 μ L of 70% formic acid were added and gently mixed with the yeasts. After the liquid medium was evaporated, the sample was covered with 1 μ L of saturated matrix solution (75 mg mL⁻¹ of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in ethanol/water/acetonitrile [1:1:1] and 0.03% trifluoroacetic acid (TFA)). Subsequently, the samples were crystallized by air-drying at room temperature for 5 minutes. Mass spectra was registered between 2,000 to 20,000 Da by using a MALDI TOF Autoflex III Mass Spectrometer (Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) set up with a 1064 nm neodymium crystal laser (Nd:Y3Al5O12) at 66% power, 104 ns delay and an acceleration voltage of +20 kV. The peak lists obtained were exported to the software package MALDI Biotyper™ 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) where spectra were analyzed, and identifications were achieved.

2.5. Electrochemical synthesis of PTAA films

The electropolymerization was performed on a PGSTAT 128 N potentiostat/galvanostat interfaced with NOVA 1.11 software (Metrohm Autolab Inc., Netherlands) inside an electrochemical cell composed of three electrodes immersed in a TAA (0.5 M) solution dissolved in 20 mL of HCl (0.1 M). A 2 mm diameter polished gold electrode was used as a working electrode, an Ag/AgCl electrode saturated with KCl and a platinum wire were used respectively as reference and counter electrodes. Electro polymerization was carried out for 40 cycles at 100 mV s⁻¹ scan rate in a range of potential between -0.2 V and +1.5 V. The obtained PTAA film was washed with deionized water to remove unbound monomers and characterized through electrochemical impedimetric spectroscopy (EIS) immersed in a PBS (10 mM, pH 7.4) solution containing 10 mM K₄[Fe(CN)₆] / K₃[Fe(CN)₆] (1:1, v/v). The analysis was performed from 100 mHz to 100 kHz frequency range under a sine wave

potential of +10 mV.

2.6. Impedimetric Analysis

Impedance responses were analyzed from the Nyquist plot well-defined circle arcs and linear parts occurring respectively at higher and lower frequencies. The equivalent circuit assigned to this semiconductor platform includes the redox probe resistance in series with the measured impedance of the faradaic reaction at the double-layer region. However, we found that the most significant component to analyze was the charge transfer resistance (R_{ct}), which represents the variation of the circles arc height and the electrical blocking that the biosensing surface experience over mass accumulation. Of note, all fluctuations observed at the semicircle portions are related to the tethering of specific materials covalently immobilized or captured with CLAVMO probe. From this analysis, R_{ct} variations reflect the concentration of the different analytes bound at the surface at each step. All characterizations were performed in triplicate devices at room temperature inside a Faraday cage.

2.7. Fabrication and Testing of *f* PTAA_TiO₂NPs_CLAVMO sensor system

PTAA carboxyl groups were activated in an EDC:NHS (0.4 M:0.1 M) aqueous solution for 30 min. After that, 4 μ L of amino-modified TiO₂ (NH₂-TiO₂NPs) nanoparticles were wise-dropped over the surface and left to incubate for 10 minutes. After washing the electrode, 2 μ L of a CLAVMO solution (615 μ M) prepared in EDC 0.4 M was immediately dropped over the PTAA_TiO₂NPs system and incubate for 10 min. A schematic diagram with the assembly process of the biosensor is shown in Fig. 1. After the covalent immobilization of CLAVMO, its bioactivity was assessed by recognition experiments with *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* at different concentrations ranging from 10¹ to 10⁶ CFU mL⁻¹. All experiments were performed testing 2 mL of each yeast solution.

3. Results and discussion

3.1. Morphological analyses of the sensor system

AFM technique was used to characterize the initial molecular modifications performed over the gold electrode. Changes in height, topography and roughness accused nanometric surface modifications. Fig. 2 shows the images captured by AFM during the platform's assembly process and testing of the biosensor. In Fig. 2a, a 64 nm well-distributed layer of PTAA is found homogeneously covering the surface. After the covalent immobilization of NH₂-TiO₂NPs, the mean height of the film increases to 73 nm (Fig. 2b); this result is in conformity with the size of the immobilized nanoparticles. After the covalent immobilization of CLAVMO presented in Fig. 2c, height increases to 80 nm. Its heterogeneous distribution at the surface had occurred for the most likely due to the large superficial area brought by TiO₂ nanoparticles, this behavior was expected since a similar topography was observed in previous reports [16,17]. Finally, the biosensor surface was studied after its exposure to four *Candida* samples: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, and *C. krusei*. The biointeraction was confirmed by the changes in surface topography and height in Fig. 2d-g, respectively. Those AFM changes bring to light that after exposing the biosensor to the candida samples, biological material with ClavMO affinity was bound to the surface. The most likely the images refer to membrane debris or the surface of yeast, but it brings no information about the amount of immobilized yeast cells.

3.2. Electrochemical characterization

The electropolymerization of 3-TAA is shown in Fig. 3a. The current of the anodic peak around 1.12 V decreases in the voltammogram. Besides, a slight continuous shift towards higher potentials can be observed. This behavior is associated with the increase of film thickness after each polymerization cycle and, therefore, an increase of charge transfer resistance (Fig. 3b red line R_{ct} = 1240 Ω). Additionally, the anodic peak around 0.53 V arises from polymeric film doping, while

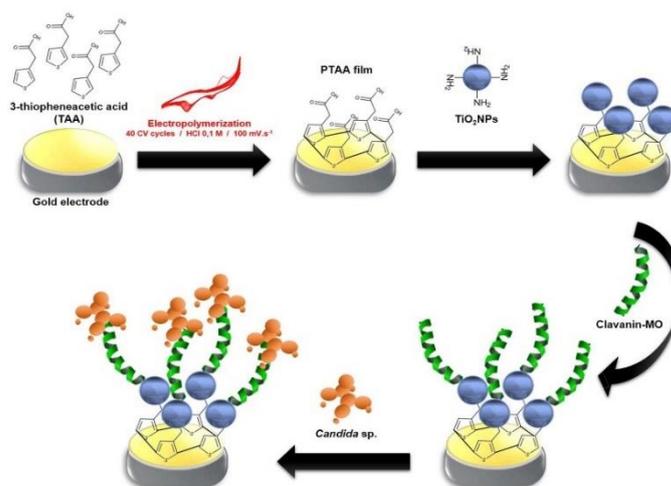


Fig. 1. Schematic diagram for the construction of PTAA_TiO₂NPs_CLAVMO-modified biosensor.

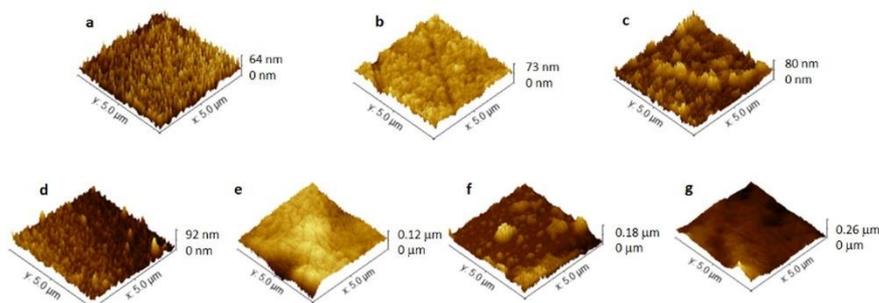


Fig. 2. 3D AFM images of the gold working electrode coated with PTAA films (a), PTAA/TiO₂NPs (b), PTAA/TiO₂NPs/CLAVMO (c), PTAA/TiO₂NPs/CLAVMO/*C. krusei* (d), PTAA/TiO₂NPs/CLAVMO/*C. glabrata* (e), PTAA/TiO₂NPs/CLAVMO/*C. tropicalis* (f) and PTAA/TiO₂NPs/CLAVMO/*C. albicans* (g).

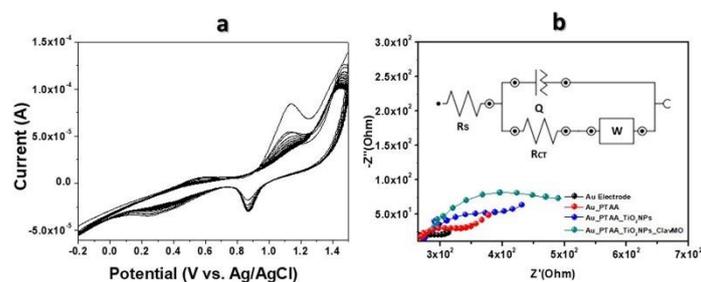


Fig. 3. Biosensor assembly process. CVs of TAA polymerization recorded in 20 mL HCl 0.1 M, potential scan rate: 100 mV s⁻¹ (a). EIS characterization of platform at each mounting step (b); Inset: Equivalent circuit adopted to fit the impedance data.

cathodic peaks around 0.28 V and 0.87 V are respectively associated with proton reduction and de-doping of the oxidized polymeric chains during the reverse scan. Carboxyl groups present in the PTAA film were covalently bonded to the aminated TiO₂NPs by EDC:NHS chemistry. As a result, EIS characterization shows that the impedimetric response (Fig. 3b blue line) increases to $R_{ct} = 1370 \Omega$. The addition of TiO₂NP enhances the sensitivity and analytical detection of the biosensor platform by means of augmented active area [18,19]. After the covalent immobilization of CLAVMO, a further increase in the semicircle diameter was observed (Fig. 3b green curve, $R_{ct} = 1790 \Omega$). Some peptide physical attributes such as a cationic surface and hydrophobic amino acids may promote resistivity increase [20].

To assess the selectivity and sensitivity of the biosensor, different *Candida* samples were tested at six different concentrations. At each measurement, the biosensor was incubated for 10 min with 2 mL of each sample. The sensing platform was freshly prepared prior to measurement. The impedimetric responses obtained after interaction with the evaluated microorganisms are shown in Fig. 4. Overall, we found that the height of the circle arc increases following the presence of a higher concentration of microorganisms. This effect is related to the cells' adherence to the biosensor, thus forming a layer that hinders the proximity of the redox probe to the electron-transfer surface.

The mathematical fitting of the Nyquist plots into a Randles model equivalent circuit was performed to evaluate analytically the impedance spectra parameters. This equivalent circuit comprises the resistance of the electrolyte solution (R_s) inserted as a series element, a constant phase element (Q) representing the pseudo-capacitance of the double layer formed at the interface of the electrode, a charge transfer

resistance (R_{ct}) and the Warburg diffusion element (W) reflecting bulk properties of the electrolyte. The obtained values for each component are listed in Table 1. Of note, Q and n factor recorded after the immobilization of TiO₂NPs confirmed the enhancement of electrochemical properties of the platform. During the testing of the biosensors one notice that at higher yeast densities R_{ct} increases linearly. Additionally, pseudocapacitance increases by the n factor, thus revealing charge blockage at the sensor surface due to specific mass accumulation. The relative variation of the R_{ct} (ΔR_{ct}) was calculated according to the following equation:

$$\Delta R_{ct}(\%) = \left| \frac{R_{CT}(Candida) - R_{CT}(Biosensor)}{R_{CT}(Biosensor)} \right| \times 100$$

Where $R_{CT}(Candida)$ corresponds to the values of R_{ct} after yeast recognition promoted by CLAVMO, and $R_{CT}(Sensor)$ is the basal response of the biosensor. Fig. 5a shows the variation ΔR_{ct} in response to the different concentrations (CFU mL⁻¹) of *Candida* spp. A linear relationship between *Candida* amounts and ΔR_{ct} was observed. ΔR_{ct} values increases as follow: *C. krusei* < *C. glabrata* < *C. tropicalis* < *C. albicans* and their linear correlation equations are $y = 41.154 + 15.562 \cdot (\ln x)$; $y = 179.997 + 11.874 \cdot (\ln x)$; $y = 318.987 + 60.309 \cdot (\ln x)$ and $y = 371.503 + 91.988 \cdot (\ln x)$, respectively. Limits of detection (calculated as $LOD = 3.33 \sigma/S$) were 2.33; 2.04; 3.73 and 3.84 respectively. Of note, LODs of haploid yeast were lower than for diploids. When developing electrochemical biosensors, the convention that the limit of detection is more a representation of the platform detection limit at which uncertainty increases when the concentration tends to zero. In other words, rather than implying that 2 or 3 cells can be detected, this

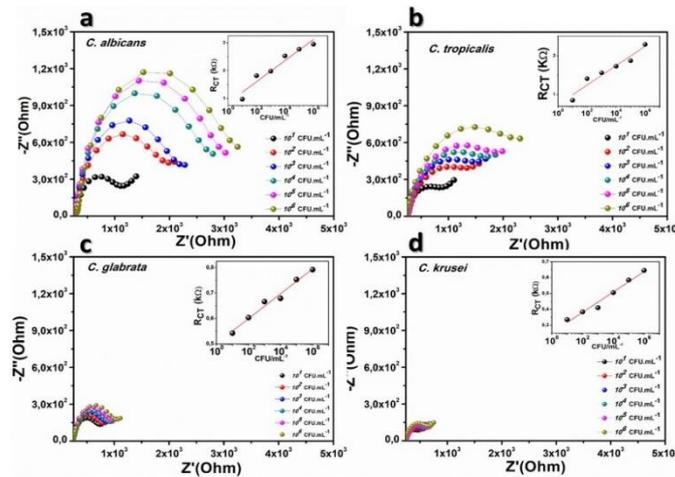


Fig. 4. Nyquist plots of the peptide-based biosensor after exposure to different concentrations (10^1 to 10^6 CFU mL $^{-1}$) of pathogenic *Candida* species: *C. albicans* (a), *C. tropicalis* (b), *C. glabrata* (c) and *C. krusei* (d).

Table 1
Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Modified electrode	<i>Candida</i> concentration (CFU mL $^{-1}$)	R _{CT} (kΩ)	Q (μS)	n
Bare gold electrode	-	0.101	0.216	0.442
PTAA	-	0.124	0.314	0.373
PTAA_TiO ₂ NPs	-	0.137	0.304	0.619
PTAA_TiO ₂ NPs_ClavaninMO	-	0.179	0.266	0.371
ClavaninMO <i>C. albicans</i>	10 ¹	0.976	7.97	0.667
	10 ²	1.82	4.4	0.672
	10 ³	1.98	2.96	0.689
	10 ⁴	2.53	2.54	0.712
	10 ⁵	2.77	2.27	0.719
	10 ⁶	2.95	2.15	0.733
ClavaninMO <i>C. tropicalis</i>	10 ¹	0.856	18.4	0.648
	10 ²	1.41	16.2	0.654
	10 ³	1.56	13.4	0.673
	10 ⁴	1.73	11.9	0.685
	10 ⁵	1.87	10.6	0.697
	10 ⁶	2.29	8.76	0.715
ClavaninMO <i>C. glabrata</i>	10 ¹	0.542	10.4	0.731
	10 ²	0.603	8.88	0.747
	10 ³	0.66	8.02	0.758
	10 ⁴	0.679	7.41	0.766
	10 ⁵	0.753	6.88	0.775
	10 ⁶	0.792	6.35	0.784
ClavaninMO <i>C. krusei</i>	10 ¹	0.328	38.3	0.597
	10 ²	0.355	32.8	0.613
	10 ³	0.388	22.9	0.651
	10 ⁴	0.398	22.1	0.655
	10 ⁵	0.422	20.8	0.661
	10 ⁶	0.469	18.7	0.672

small value assures the linearity of the biosensing response within the range of study and therefore the accuracy of the measurements.

To understand the capture progress of yeasts, the coverage (θ) of the biosensing sites (biosensor surface) can be calculated as follow:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT}(\text{Biosensor})}{R_{CT}(\text{Candida})}$$

where $R_{CT}(\text{Biosensor})$ is the charge transfer resistance for the initial biosensor system and $R_{CT}(\text{Candida})$ is the charge transfer resistance recorded after interaction with *Candida spp.* samples. Surface coating represents available CLAVMO recognition sites already occupied by yeasts; the results are showed plotted in Fig. 5b as $\theta\%$ in function of sample concentration. A directly proportional relationship was observed, where $\theta\%$ increased with the increasing amounts of *Candida* bounded from 10^1 to 10^6 CFU mL $^{-1}$. From 10^1 CFU mL $^{-1}$ $\theta\%$ increased noticeably in all samples and at 10^3 CFU mL $^{-1}$ $\theta\%$ is found to be 88% and 91% for *C. tropicalis* and *C. albicans* respectively, while *C. glabrata* and *C. krusei* presented lower values, 73% and 53% respectively. This parameter is a calculation obtained from a single element of the equivalent circuit, and it is not a representation of the dimensions of the materials attached at the surface [21]. Of note, what theta represents is the kinetics of the redox probe instead. In this context, surface coverage indicates the biosensor's responsiveness, meaning that 40–80% coverage is the percentage of surface area hindered by the sample.

Data obtained from Randles' equivalent circuit also gave useful information related to the differentiation of *Candida spp.* after binding to the biosensor. Three variables, R_{CT} , Q , and n showed a characteristic value for each *Candida* species. Accordingly, a 3D plot with these elements was created, as shown in Fig. 6. We can observe an effective data distribution in the plot as a function of the studied species. *C. albicans* (blue circles) and *C. tropicalis* (purple triangles) are located in the region of higher R_{CT} , indicating a higher blocking effect of the AMP-modified sensor and higher insertion and permeabilization of these microorganisms to CLAVMO. On the other hand, *C. glabrata* is located in an area of lower R_{CT} and higher n values and *C. krusei* also located in lower R_{CT} , higher n values. Although these results correlate to a small blocking effect, the pseudocapacitive dispersion is larger.

Clavanin A (VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV-NH₂) is a cationic peptide used successfully to detect bacteria [16,17]. The increment of non-polar amino acid residues (FLPII) showed improved hydrophobicity

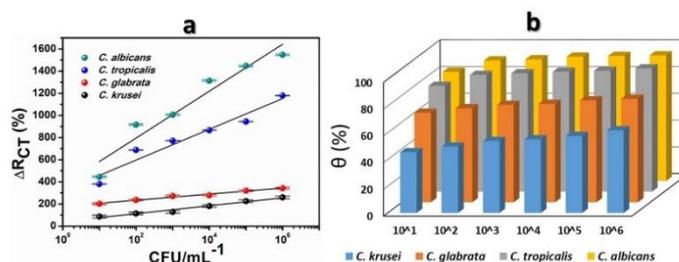


Fig. 5. ΔR_{ct} % (a) and microbial surface coverage " θ "% (b) of the biosensor system after exposure to different concentrations of *Candida* strains. All experimental data used to calculate ΔR_{ct} % and θ are shown in Table 1.

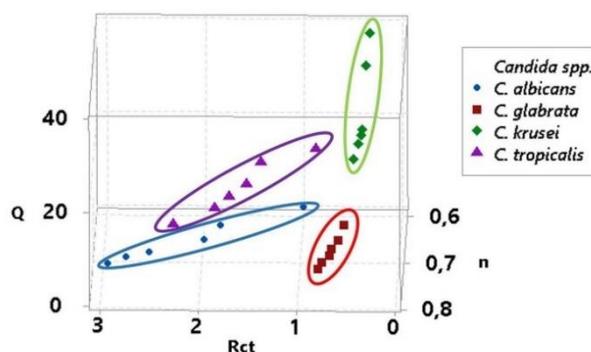


Fig. 6. 3D plot for values of n , Q , and R_{ct} shown in Table 1.

towards lipids. However, most yeasts' cell wall comprises carbohydrates related to immune recognition such as mannans, glucans, chitin, and proteins [12,22] while lipids represent a minor component [23]. Our results show two distinct groups of impedimetric responses. *C. Albicans* and *C. tropicalis*, close related species are known for being diploid cells presented higher impedimetric responses than haploid species *C.krusei* and *C. glabrata*. Phenotypically, this behavior might be associated to the fact that diploid yeasts possess two sets of identical DNA molecules, directly boosting their larger volume when compared to haploids. However, at the molecular level, one should note that the cell wall components of diploid yeasts are downregulated. In contrast, haploid cells are expected to have more dynamic biochemistry originated from their mating pheromone pathways [14]. Therefore, CLAVMO appears to have particular membrane affinity and a mode of action triggered by the pH, involving both membrane lipids and membrane proteins. In any case, our electrochemical biosensor was able to discriminate *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei* in terms of their ploidy related features. Ploidy was confirmed by MALDI-TOF MS analyses. The obtained spectra revealed differences among the studied species (please see supplementary material). *C. glabrata* and *C. krusei* showed a higher diversity of peaks than *C. albicans* and *C. tropicalis*. This behavior can be explained due to diploidy of these species, which encode gene expression repressor proteins. The peaks refer to proteins ionized by the laser and detected according to their mass/charge ratio. Each protein has its mass annotation in Daltons. In microorganisms, the proteins detected are mainly ribosomal, as they are the most conserved and useful in identification and diagnosis.

In account of our biosensor, biorecognition was promoted by both

Candida spp. negatively charged surface with cationic CLAVMO which increased the membrane potential following its permeabilization [24]. The pattern obtained in the 3D graph enables the distinction among *Candida* species in clinically relevant concentrations. To the best of our knowledge, the CLAVMO-based biosensor is a novel approach in discriminating yeasts such as *Candida* through electrochemical analyses. Altogether, the detection event and its electrochemical evaluation took less than 20 min to perform. A comparison of the proposed biosensor with other reported biosensors developed for the identification of *Candida* spp. with their LOD is shown in Table 2.

4. Conclusions

A fast and sensitive detection of *Candida* strains by a novel electrochemical AMP-based biosensor was demonstrated. The sensor system based on electropolymerized PTAA nanofilms, TiO₂NPs, and peptide CLAVMO was able to discriminate *Candida* species by means of their ploidy, where *Candida albicans* and *Candida tropicalis* presented the highest electrochemical response analyzed through the impedimetric technique. An excellent limit of detection was achieved for each ploidy group and the impedimetric responses showed linearity from 10¹ CFU mL⁻¹ and 10⁶ CFU mL⁻¹. In addition, changes in the charge transfer resistance and other electrical components modelled by the electrical equivalent circuit revealed a remarkable separation of the results, allowing an easy differentiation of species and ploidy groups after the binding event. In a typical biotechnological process, single-strain cultures are grown during the seed train to increase viable cells. Thereafter, during bioreactor culture, nutrient utilization, biomolecules production,

Table 2
Comparison of sensor platforms developed to detect pathogenic *Candida* spp. and present work.

Sensing element	Target fungi	Detection limit (CFU mL ⁻¹)	Technique	Reference
Antibody	<i>C. albicans</i>	10 ¹	Electrochemical impedance spectroscopy (EIS)	[25]
Antibody	<i>C. albicans</i>	50	Field-effect Transistor	[26]
-	<i>C. krusei</i>	500	PCR + Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)	[27]
-	<i>C. guilliermondii</i>	-	-	-
Antibody	<i>C. albicans</i>	10 ⁶	Surface Plasmon Resonance (SPR)	[28]
-	<i>C. albicans</i>	10 ⁶	Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)	[29]
Lectin	<i>C. albicans</i>	32	UV resonance Raman spectroscopy	[30]
Antimicrobial peptide (Clavuin-MO)	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i>	2-4	Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)	This work.

and vitality of yeast can be monitored on the basis of its ploidy. In this context, our biosensor addresses an important quandary that is currently subjectively inferred with flow cytometry or analyzed with the more complicated MALDI-TOF. PTAA-TiO₂-NP_s-CLAVMO biosensor system can become an alternative biomedical application or could be used in biotechnological processes as a strategy to monitor the ploidy modes of culture to improve production yields.

CRedit authorship contribution statement

Kalline L. Ribeiro: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Isaac A.M. Frías:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Alberto G. Silva:** Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Reginaldo G. Lima-Neto:** Validation, Formal analysis, Funding acquisition. **Sandra R. Sá:** Investigation, Formal analysis. **Octávio L. Franco:** Validation, Formal analysis, Funding acquisition. **Maria D.L. Oliveira:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition. **Cesar A.S. Andrade:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 314894/2018-7 and 314756/2018-3). Kalline L. Ribeiro and Alberto G. Silva Júnior would like to thank FACEPE and CAPES for their scholarships.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107918>.

References

- [1] T. Satyanarayana, G. Kunze, *Yeast biotechnology: diversity and applications*, Springer, 2009.
- [2] B.K. Mable, Ploidy evolution in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a test of the nutrient limitation hypothesis, *J. Evol. Biol.* 14 (2001) 157–170.
- [3] R.N.H. Seervai, S.K. Jones Jr., M.P. Hirakawa, A.M. Pomm, R.J. Bennett, Paraxuality and ploidy change in *Candida tropicalis*, *Eukaryot. Cell* 12 (2013) 1629–1640, <https://doi.org/10.1128/EC.00128.13>.
- [4] T. Tamino, T. Aoki, W. Chung, Y. Watanabe, C. Ogino, H. Fukuda, A. Kondo, Improvement of a *Candida antarctica* lipase B-displaying yeast whole-cell biocatalyst and its application to the polyester synthesis reaction, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (2009) 59–66.

- [5] R. Lima-Neto, C. Santos, N. Lima, P. Sampaio, C. Pais, R.P. Neves, Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection, *Brazilian J. Microbiol.* 45 (2014) 515–522.
- [6] M. Aminnejad, M. Cogliati, S. Duan, M. Arabatzis, K. Tittelmoet, E. Castañeda, M. Lazza, A. Velezokaj, D. Ellis, T.C. Serpell, Identification and characterization of VNI/VNII and novel VNI/VNII hybrids and impact of hybridization on virulence and antifungal susceptibility within the *C. neoformans/C. guilii* species complex, *PLoS One* 11 (2016), e0163955.
- [7] A.E.M. Roberto, D.E. Xavier, E.E. Vidal, C.F. de L. Vidal, R.P. Neves, R.G. de Lima-Neto, Rapid Detection of *Echinocandins* Resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* Complex, *Microorganisms* 8 (2020) 109.
- [8] V. Sirdeshmukh, C. Tagad, R. Vyas, A. Kale, Nanomaterial Enabled Rapid Electrochemical Biosensors for Bacterial Pathogens, *Advances in Bioengineering*, Springer, 2020, pp. 171–182.
- [9] E. Pardoux, D. Boturyn, Y. Roupioz, Antimicrobial Peptides as Probes in Biosensors Detecting Whole Bacteria: A Review, *Molecules* 25 (2020) 1998.
- [10] S.M. Mandal, J. Khan, D. Mahata, S. Saha, J. Sengupta, O.N. Silva, S. Das, M. Mandal, O.L. Franco, A self-assembled clavuin A-coated amionic membrane scaffold for the prevention of biofilm formation by ocular surface fungal pathogens, *Biofouling* 33 (2017) 881–891, <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1383400>.
- [11] O.N. Silva, C. de la Fuente Núñez, E.F. Haney, L.C.M. Fensterseifer, S.M. Ribeiro, W.F. Porto, P. Brown, C. Faria-Junior, T.M.B. Rezende, S.E. Moreno, T.K. Lu, R.E. W. Hancock, O.L. Franco, An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35465, <https://doi.org/10.1038/srep35465>.
- [12] E. Reyna Beltrni, C.I.B. Mndez, M. Iranzo, S. Mormenico, J.F. Luna Arias, The Cell Wall of *Candida albicans*: A Proteomics View, in: D. Sandal (Ed.), *Candida Albicans*, IntechOpen, 2019, pp. 71–92.
- [13] L. Angiolilla, M. Facchin, A. Stringaro, B. Marrs, N. Simonetti, A. Cassone, Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics, *J. Infect. Dis.* 173 (1996) 684–690.
- [14] A.C. Gerstein, L.A. Cleathero, M.A. Mandegar, S.P. Otto, Haploids adapt faster than diploids across a range of environments, *J. Evol. Biol.* 24 (2011) 531–540.
- [15] R. Sharma, A. Sarkar, R. Jha, A. Kumar Sharma, D. Sharma, Sol-gel-mediated synthesis of TiO₂ nanocrystals: Structural, optical, and electrochemical properties, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 17 (2020) 1400–1409.
- [16] J.L. de Miranda, M.D.L. Oliveira, I.S. Oliveira, L.A.M. Frias, O.L. Franco, C.A. S. Andrade, A simple nanostructured biosensor based on clavuin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection, *Biochem. Eng. J.* 124 (2017), <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.013>.
- [17] A.G. Silva Junior, M.D.L. Oliveira, I.S. Oliveira, R.G. Lima-Neto, S.R. Sá, O. L. Franco, C.A.S. Andrade, A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavuin A peptide for bacterial detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 255 (2018) 3267–3274, <https://doi.org/10.1016/j.smb.2017.09.153>.
- [18] J. Bai, B. Zhou, Titanium Dioxide Nanomaterials for Sensor Applications, *Chem. Rev.* 114 (2014) 10131–10176, <https://doi.org/10.1021/cr400625j>.
- [19] N.P. Shetti, S.D. Bukkitgar, K.R. Reddy, C.V. Reddy, T.M. Aminabhavi, Nanostructured titanium oxide hybrids based electrochemical biosensors for healthcare applications, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 178 (2019) 385–394, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.013>.
- [20] L.T. Nguyen, E.F. Haney, H.J. Vogel, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 464–472, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.
- [21] W. Guo, S. Chen, Y. Feng, C. Yang, Investigations of triphenyl phosphate and bis-(2-ethylhexyl) phosphate self-assembled films on iron surface using electrochemical methods, Fourier transform infrared spectroscopy, and molecular simulations, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 3109–3115.
- [22] N.A.R. Gow, B. Hube, Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection, *Curr. Opin. Microbiol.* 15 (2012) 406–412, <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2012.04.005>.
- [23] J. Ruiz-Herrera, M. Victoria Elerza, E. Valentin, R. Santandreu, Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 14–29, <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x>.

- [24] B. Mishra, G.D. Leishangthem, K. Gill, A.K. Singh, S. Das, K. Singh, I. Xess, A. Dinda, A. Kapil, I.K. Patro, S. Dey, A novel antimicrobial peptide derived from modified N terminal domain of bovine lactoferrin: Design, synthesis, activity against multidrug resistant bacteria and *Candida*, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1828 (2013) 677–686, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.09.021>.
- [25] D. Kwasny, S.E. Tehrani, C. Almeida, I. Schjodt, M. Dimski, W.E. Svendsen, Direct detection of *Candida albicans* with a membrane based electrochemical impedance spectroscopy sensor, *Sensors (Switzerland)* 18 (2018) 1–9, <https://doi.org/10.3390/s18072214>.
- [26] R.A. Villamizar, A. Maroto, F.X. Rius, Improved detection of *Candida albicans* with carbon nanotube field-effect transistors, *Sensors Actuators, B Chem* 136 (2009) 451–457, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.10.013>.
- [27] D. Metzgar, M. Frinder, R. Lovari, D. Toleno, C. Massire, L.B. Blyn, R. Rauken, H. E. Carolan, T.A. Hall, D. Moore, C.J. Hansen, R. Sampath, D.J. Ecker, Broad-spectrum biosensor capable of detecting and identifying diverse bacterial and *Candida* species in blood, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 2670–2678, <https://doi.org/10.1128/JCM.00966-13>.
- [28] S. Yodhongkoi, S. Thaweboon, B. Thaweboon, C. Puthangsa, B. Sutapun, R. Ananti, A. Sombonkaew, T. Srikiatun, Application of surface plasmon resonance biosensor for the detection of *Candida albicans*, *Jpn. J. Appl. Phys.* 55 (2016), <https://doi.org/10.7567/JJAP.55.02BE03>.
- [29] Y.L. Pan, T.S. Yang, T.C. Chang, H.C. Chang, Rapid identification of *Candida albicans* based on Raman spectral biosensing technology, *Conf. Nano/Molecular Med. Eng. NANOMED 2009 (2009)* 120–124, <https://doi.org/10.1109/NANOMED.2009.5559104>.
- [30] Z. Cai, D.H. Kwak, D. Punhaole, Z. Hong, S.S. Velankar, X. Liu, S.A. Asher, A Photonic Crystal Protein Hydrogel Sensor for *Candida albicans*, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54 (2015) 13036–13040, <https://doi.org/10.1002/anie.201506205>.

APÊNDICE B – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INTELECTUAL (INPI)

Depósito realizado no Instituto Nacional de propriedade Intelectual (INPI). Número do processo: BR 10 2020 003934 2



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 003934 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/02/2020 às 17:04, Petição 870200026623

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO CATÓLICA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 00331801000130

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: QS 01, Rua 212, Lotes 19-21-23, Sala 2903, Edifício Connect Towers

Cidade: Taguatinga

Estado: DF

CEP: 71950-550

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/02/2020 às 17:04, Petição 870200026623

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): NANOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS E USOS

Resumo: 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 (TiO₂NPs) funcionalizadas com aminopropiltriétoxissilano (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 microrganismo 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 microrganismos, 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 microrganismos estudados. O sistema sensor apresenta um limite de detecção de 10¹ UFC mL⁻¹.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: KALLINE LOURENÇO RIBEIRO
CPF: 000.000.000-00
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Rua 1000, nº 1000, Jd. Primavera, Recife, PE
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 51000-000
País: BRASIL
Telefone: (71) 3333-3333
Fax: (71) 3333-3333
Email: kalline_farmajp@hotmail.com

Inventor 2 de 8

Nome: ISAAC AARÓN MORALES FRIAS
CPF: 000.000.000-00
Nacionalidade: Mexicana
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Rua 1000, nº 1000, Jd. Primavera, Recife, PE
Cidade: Jaboatão dos Guararapes
Estado: PE
CEP: 51000-000
País: BRASIL
Telefone: (71) 3333-3333
Fax: (71) 3333-3333
Email: iam.ibt@gmail.com

Inventor 3 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/02/2020 às 17:04, Petição 870200026623

Nome: ALBERTO GALDINO DA SILVA JUNIOR
CPF: 000.000.000-00
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Rua ...
Cidade: Olinda
Estado: PE
CEP: 55000-000
País: BRASIL
Telefone: (00) 0000-0000
Fax:
Email: albertogaldino16@gmail.com

Inventor 4 de 8

Nome: MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA
CPF: 000.000.000-00
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço: Rua ...
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 50000-000
País: BRASIL
Telefone: (00) 0000-0000
Fax:
Email: m_danielly@yahoo.com.br

Inventor 5 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/02/2020 às 17:04, Petição 870200026623

Nome: REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço:

Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: goncalves_reginaldo@hotmail.com

Inventor 6 de 8

Nome: SANDRA REGINA DE SÁ

CPF:

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço:

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: gi_212@hotmail.com

Inventor 7 de 8

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/02/2020 às 17:04, Petição 870200026623

Nome: OCTÁVIO LUIZ FRANCO
CPF:
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço:
Cidade: Campo Grande
Estado: MS
CEP:
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: ocfranco@gmail.com

Inventor 8 de 8

Nome: CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE
CPF:
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Pesquisador
Endereço:
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP:
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: csrandrade@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/02/2020 às 17:04, Petição 870200026623

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
GRU 200	29409161915468590.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	68590.pdf
Procuração	Procuração UBEC.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Cadastro SisGen	Cadastro SisGen.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: ADA3C3A

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 13/11/2019

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

Candida albicans, Candida tropicalis, Candida glabrata, Candida krusei

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/02/2020 às 17:04, Petição 870200026623

___ SIAFI2020-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
12/02/20 10:21 USUARIO : JESSICA
DATA EMISSAO : 06Fev20 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2020GR800042
UG/GESTAO EMITENTE : 153105 / 15233 - GABINETE DO REITOR DA UFPE-GR
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 153105 GESTAO : 15233
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: FEV20 VENCIMENTO: 06Fev20
DOC. ORIGEM: 153105 / 15233 / 2020NP000061 PROCESSO : 23076.0005513/202
RECURSO : 3
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409161915468590
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
DOCUMENTO N. NOSSO-NÚMERO 29409161915468590 DO INPI -INSTITUTO NACIONAL DE PRO
PRIEDADE INDUSTRIAL.
LANCADO POR : 16883470468 - EDLEIDE UG : 153105 06Fev2020 15:06
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA



PROCURAÇÃO

OUTORGANTE: UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO CATÓLICA (UBEC), associação civil, confessional, de direito privado, sem fins econômicos, de caráter educacional, assistencial, cultural e filantrópico, inscrita no CNPJ sob o N° 00.331.801/0001-30, com Sede na QS 01, Rua 212, Lotes 19, 21 e 23, Sala 2.903, Ed. Connect Towers, Taguatinga, Distrito Federal, Cep 71950-550 e com Escritório Executivo no SMPW, Quadra 05, Conjunto 13, Lote 08, Núcleo Bandeirante, Distrito Federal, filial inscrita no CNPJ N° 00.331.801/0010-20, Mantenedora da **UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA (UCB)**, reconhecida pela Portaria N° 1.827, de 28/12/94, do Excelentíssimo Senhor Ministro de Estado da Educação e do Desporto, publicada no DOU em 30/12/94, Seção 1, Página 21.241, inscrita no CNPJ sob o N° 00.331.801/0004-82, com Sede na QS 07, Lote 01 – EPCT, Águas Claras, Taguatinga, DF, Cep 71966-700, neste ato representada por seu representante legal **José Romualdo Degasperi**, brasileiro, solteiro, Conselheiro Presidente da UBEC, portador da cédula de identidade RG 3.613.570 SSP/DF, inscrito no CPF/MF sob N° _____, residente e domiciliado em Brasília, DF, no exercício da competência que lhe foi delegada pela Ata da Assembleia Geral Eletiva N° 125 da UBEC, de 23 de novembro de 2018.

OUTORGADO: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), autarquia educacional vinculada ao Ministério da Educação, por meio do Decreto Lei N° 9.388, de 20/06/45 (Decreto N° 62493, de 01/04/68 e Decretos N° 53, de 18/11/66 e 252 de 28/02/67), inscrita no CNPJ/MF sob o N° 24.134.488/0001-08, com Sede na Avenida Professor Moraes Rego N° 1.235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, representada por seu Magnífico Reitor **Alfredo Macedo Gomes**, brasileiro, divorciado, professor universitário, portador da RG N° 2.680.490 SSP/PE e inscrito no CPF/MF sob o N° _____, nomeado pelo Decreto Presidencial de 09 de outubro de 2019, publicado no D.O.U. de 10.10.2019, Seção 2, pág. 01, e a Diretora de Inovação do Gabinete do Reitor **Maira Galdino da Rocha Pitta**, brasileira, solteira, professora universitária, residente e domiciliada em Recife, portadora do CPF _____, cujos poderes lhe foram outorgados pelo referido Magnífico Reitor no exercício da competência que lhe foi delegada pela Portaria N° 4.195 de 24 de outubro de 2019.

PODERES: por este instrumento particular de mandato ficam outorgados poderes especiais para o OUTORGADO representar o OUTORGANTE no país e em terceiros países, perante a União, os Estados, o Distrito Federal e os Territórios, seus órgãos de administração direta e indireta, inclusive o Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI e perante o poder Judiciário, para o fim de obter a proteção de direitos relativos à Propriedade industrial e/ou Intelectual e agir na defesa ativa e passiva dos interesses do Outorgante especificamente para o pedido de patente de invenção de cotitularidade da UBEC/UCB e UFPE, **“NANOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E USOS”**, podendo, para tais efeitos, depositar pedido de patente de invenção ou de modelo de utilidade, pagar as retribuições e anuidades devidas, requerer as prorrogações ou renovações cabíveis; apresentar protestos, oposições, petições, recursos, réplicas e defesas, escritas ou orais; requerer licenças compulsórias, caducidade, e instauração de processos administrativos ou de nulidade, retirada de certificado, bem como praticar todo e qualquer outro ato que se faça necessário ao bom e fiel cumprimento desta procuração, podendo ainda agir em separado, independente da ordem de nomeação, ficando ratificados os atos eventualmente já praticados.

Brasília/DF, 06 de janeiro de 2020.


 União Brasileira de Educação Católica - UBEC
 José Romualdo Degasperi
 Conselheiro Presidente

 **CARTÓRIO DO 5º OFÍCIO DE NOTAS DE TAGUATINGA - DF**
QNA-04, Lotes 32/34, Praça do DI - Taguatinga - DF | (61) 3961-8900
www.cartorio5df.com.br | atendimento@cartorio5df.com.br
Tabelião: Ronaldo Ribeiro de Faria | consulte o selo: www.tjdf.jus.br

Reconheço por AUTENTICIDADE a firma de:
[2BzMcKj0] - JOSE RONALDO DEGASPERI

Selo: TJDFT2020000343410i8X
Taguatinga-DF, 24 de Janeiro de 2020

ELIENE GOMES LIMA SAMPAIO SILVA
ELIENE GOMES LIMA SAMPAIO SILVA
ESCREVENTE AUTORIZADA



**NANOSSENSOR BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS
PATOGENICOS**

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 (TiO₂Nps) funcionalizadas com aminopropiltriétoxissilano (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, TiO₂NPs, 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

2/15

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 (TiO₂NPs) 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. tem 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 a 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 (R_{CT}) são o principal parâmetro de avaliação, o qual após a interação com o analito-alvo, o R_{CT} 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 microorganismos, 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; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010). Em adição, de acordo com a diferente constituição da parede celular dos microorganismos, 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 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

6/15

sistemas de biossensores com dispositivos nanoestruturados baseados em TiO₂, PTAA e o peptídeo Clavanina-MO em sua composição. Embora tais documentos apresentem semelhança em relação a presente patente, as diferenças existentes podem ser observadas através da comparação de seus componentes, apresentada na Tabela I abaixo:

14. 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

15. A novidade da presente invenção está na composição da plataforma sensora formada por filmes de PTAA, TiO₂NPs funcionalizadas com APTES e um novo peptídeo antimicrobiano, a Clavanina-MO (FLPIIVFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV-NH₂) nunca antes explorada na construção de biossensores, utilizando a técnica impedimétrica para a biodetecção de microorganismos de interesse clínico.

Problemas do estado da técnica

16. 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

17. O objetivo da presente invenção é apresentar um biossensor eletroquímico nanoestruturado com TiO_2NPs de o peptídeo Clavanina-MO. Esta permite a detecção e diferenciação de cândidas patogênicas, podendo ser usada como uma eficiente técnica no diagnóstico de candidemias e candidíase invasiva.

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

19. A detecção 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).

20. O limite de detecção obtido foi de 10^1 UFC mL^{-1} , podendo alcançar até 10^6 UFC mL^{-1} . Ademais, o biossensor proposto

8/15

apresenta a capacidade de miniaturização por associar a técnica eletroquímica com nanomateriais.

Solução do Problema

21. 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 aminopropiltrióxido de silano que lhe conferiu grupamentos amina a 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

22. O dispositivo apresentado na invenção é capaz de detectar, através de técnicas eletroquímicas, carboidratos presentes da 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.

9/15

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

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

25. Nanopartículas metálicas, sobretudo as TiO_2NPs que também tem um papel essencial na migração estável dos elétrons, favorecendo e aprimorando a sensibilidade da técnica.

26. Com um limite de detecção de 10^1 UFC mL^{-1} , o biossensor proposto se destaca dentre as demais técnicas disponíveis no ambiente clínico.

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

Descrição da Invenção

28. 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.

29. Resumidamente, a montagem da plataforma inicia-se, primeiramente, pela polimerização eletroquímica do PTAA no eletrodo de ouro, em seguida a modificação de superfície das TiO_2NPs com APTES, seguida de sua adição ao eletrodo modificado e posterior acoplamento do peptídeo Clavanina-MO ao sistema sensor.

10/15

30. A polimerização do PTAA foi realizada da seguinte forma: Inicialmente, O eletrodo do disco de ouro foi inicialmente polido em lixa com água deionizada. Para uma limpeza completa, permaneceu 30 minutos embebido em NaClO, finalmente foi enxaguado com água ultrapura. Posteriormente, 20 mL de uma solução 0,5M de ácido 3-tiofeno acético (3TAA) em 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^{-1} . Finalmente, o filme foi lavado com água deionizada para remover monômeros não absorvidos.

31. A modificação química das NPsTiO₂ consistiu na adição de grupos amino em sua superfície. Para isso, foi utilizado 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) via reação de co-condensação. Para isso, 0,5g de TiO₂NPs (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

32. A construção do biossensor segue a seguintes etapas:

11/15

33. (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 TiO₂NPs-APTES foram aplicados no eletrodo modificado. 10 minutos depois, o EDC:NHS foi novamente adicionado para ativar os grupos amino livres presentes na superfície das TiO₂NPs; (3) o eletrodo previamente modificado por PTAA_EDC:NHS_TiO₂NPs_EDC:NHS foi submetido a 2µL de solução de Clavanina-MO por 10 minutos; (4) por fim, 2µL de solução contendo diferentes concentrações (10¹ a 10⁶ UFC mL⁻¹) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* foram incubadas na superfície do eletrodo modificado por 10 minutos, seguida da análise eletroquímica.

34. (3) o eletrodo previamente modificado por PTAA_EDC:NHS_TiO₂NPs_EDC:NHS foi submetido a 2µL de solução de Clavanina-MO por 10 minutos; (4) por fim, 2µL de solução contendo diferentes concentrações (10¹ a 10⁶ UFC mL⁻¹) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* foram incubadas na superfície do eletrodo modificado por 10 minutos, seguida da análise eletroquímica.

35. 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

12/15

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 contra-eletrodo 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 $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, dentro de uma gaiola de Faraday.

Listagem e Descrição de Figuras

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

37. 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

38. Na figura 2 observa-se o voltamograma cíclico referente a 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.

39. 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

13/15

nanopartículas de TiO₂ funcionalizadas ao filme de PTAA aumentou a resistência a transferência de carga, dando origem ao espectro em azul. Por fim, a ligação do C-terminal do peptídeo Clavanina-MO à amina livre na TiO₂NPs resultou no aumento do R_{CT} com o bloqueio da passagem da corrente de elétrons da sonda redox ao eletrodo, resultando no espectro de cor verde.

40. Por fim, na figura 4 temos a resposta impedimétrica do biossensor frente as 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 (10¹ a 10⁶ UFC 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

41. 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, 2015. p. 137–186.

42. GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Journal Of Applied**

Biomedicine, n. January, p. 57–64, 2008.

43. LAGUNES, L.; RELLO, J. Invasive candidiasis: From mycobiome to infection, therapy, and prevention. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 1221–1226, 2016.

44. LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 2008.

45. LÓPEZ, M. M. et al. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current issues in molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 13–46, 2009.

46. MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.

47. NAZIR, A.; KADRI, S. An overview of hospital acquired infections and the role of the microbiology laboratory. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 21, 2014.

48. PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 4–7, 2010.

49. SALEEM, M. Biosensors a promising future in measurements. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 51, p. 012012, 2013.

50. SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured

impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.

51. SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 1023–1052, 2016.

52. TERATO, K. et al. Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. **Journal of Immunological Methods**, v. 407, p. 15–25, 2014.

REIVINDICAÇÕES

1. BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO configurado para a detecção de microrganismos, constituído 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 (TiO₂NPs);
 - (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;

2/3

- (c) TiO₂NPs funcionalizadas com aminopropiltriétoxissilano (APTES) para obtenção superficial de grupos amina (-NH₃) 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 BIOSENSOR 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 BIOSENSOR 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 parâmetro observados na reivindicação 6;
- (e) avaliação dos espectros de impedância obtidos após interação com a amostra contendo microorganismos, adquirindo os valores da resistência a transferência de carga (R_{CT}) através da variação do diâmetro do semicírculo alcançado na análise.

3/3

8. USO DO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DA REIVINDICAÇÃO 1, onde os analitos-alvo são microrganismos, compreendendo principalmente fungos do tipo leveduras do gênero *Candida*, além de bactérias e protozoários.

1/4

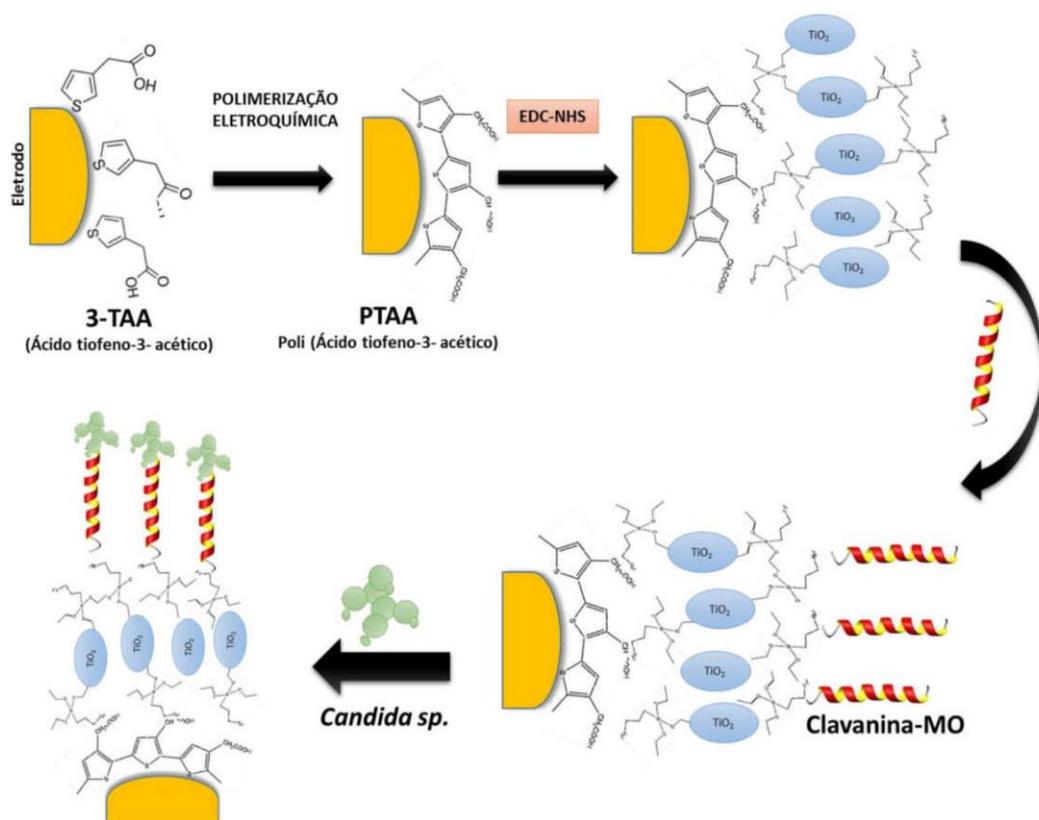


Figura 1

2/4

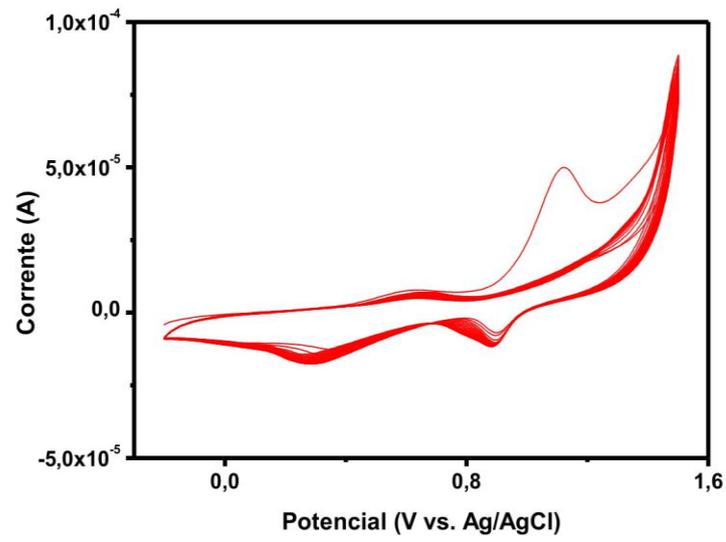


Figura 2

3/4

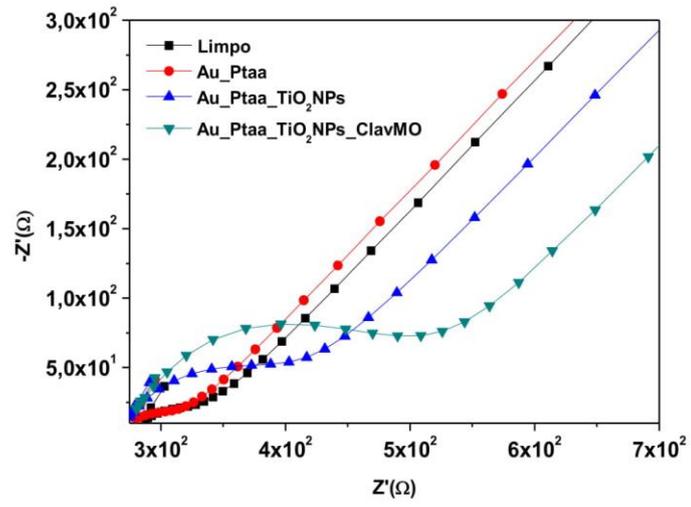


Figura 3

4/4

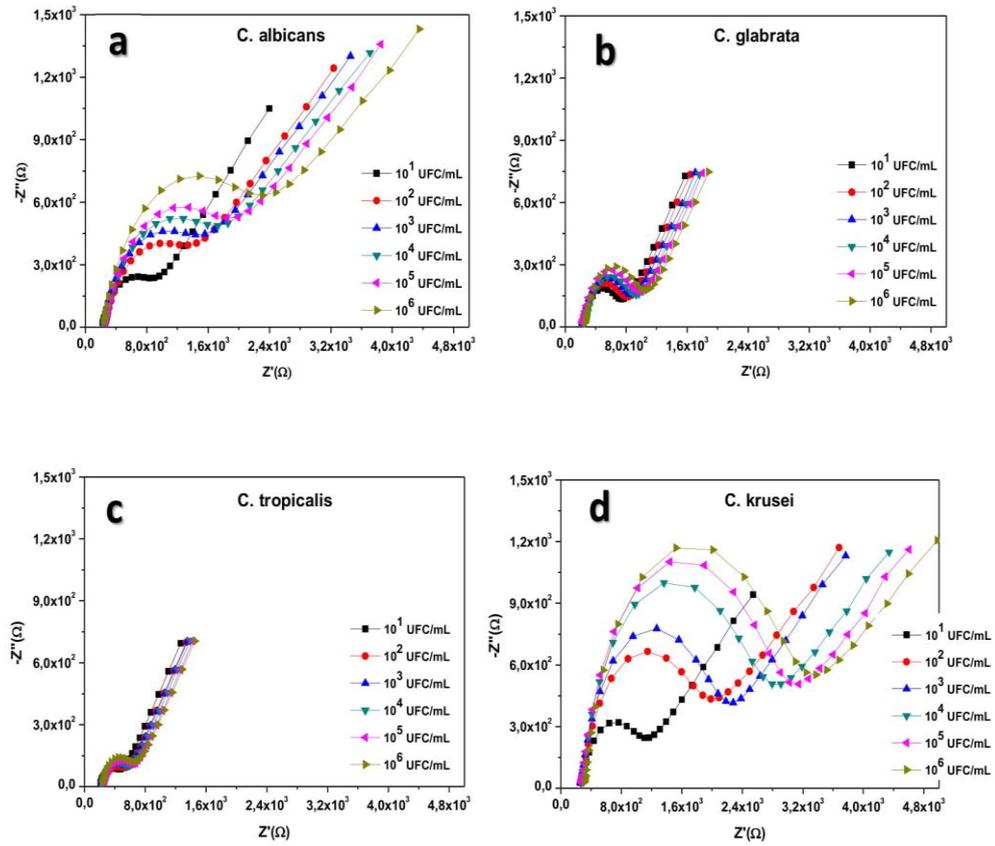


Figura 4

1/1

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

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 (TiO₂NPs) funcionalizadas com aminopropiltriétoxissilano (APTES) adsorvido na superfície do eletrodo de ouro previamente modificado com uma camada de filme de ácido poli-3-tiofeno acético (PTAA). Microrganismos como bactérias e leveduras da espécie *Candida* podem ser identificados por meio do dispositivo aqui apresentado. A composição da parede celular de cada microrganismo 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 microrganismos, 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 microrganismos estudados. O sistema sensor apresenta um limite de detecção de 10¹ UFC mL⁻¹.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº ADA3C3A

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **ADA3C3A**
 Usuário: **Kalline Lourenço Ribeiro**
 CPF/CNPJ:
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Candida albicans
Candida tropicalis
Candida glabrata
Candida krusei

Título da Atividade: **NANOSSENSOR BASEADO EM PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
 CLAVANINA-MO PARA DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS**

Equipe

Kalline Lourenço Ribeiro	INDEPENDENTE
Isaac Aaón Morales Frias	UFPE
Alberto Galdino da Silva Junior	UFPE
Maria Danielly Lima de Oliveira	UFPE
Reginaldo Gonçalves de Lima Neto	UFPE
Sandra Regina de Sá	UFPE

Octávio Luiz Franco

Universidade Católica de Brasília

César Augusto Souza de Andrade

UFPE

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Congressos e eventos científicos.**

Data do Cadastro: **13/11/2019 15:37:21**

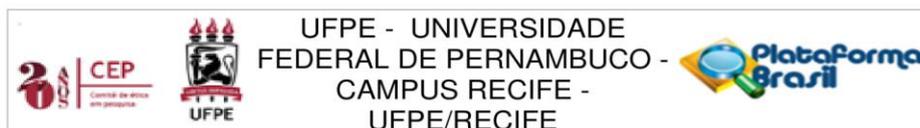
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:38** de **13/11/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO C– PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DE OSTEÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS: APLICAÇÃO NA ODONTOLOGIA

Pesquisador: CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24708319.3.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.794.214

Apresentação do Projeto:

O Projeto intitulado PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DE OSTEÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS: APLICAÇÃO NA ODONTOLOGIA, trata-se de uma pesquisa com a finalidade de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação sob a responsabilidade do Prof. Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues do Departamento de Biofísica e Radiobiologia. Compõe a equipe a Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva, a discente Taynara Franciele da Silva Souza e a doutoranda Lara Marques Magalhães Moreno.

A questão da pesquisa aborda alternativas terapêuticas que possam evitar danos no sistema biológico provocados pelo uso de materiais odontológicos convencionais. Propõe as terapias com células-tronco (CTMs) por fazer parte de um processo natural e eficaz como uma abordagem real e promissora para substituir terapias convencionais utilizadas na odontologia e como uma fonte terapêutica alternativa para regeneração dentária.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da pesquisa é avaliar o potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais originadas do cordão umbilical humano cultivadas em associação as proteínas morfogenéticas ósseas. Os objetivos específicos da pesquisa serão: coletar e processar o cordão umbilical humano; cultivar células troncos extraídas da geleia de Wharton; caracterizar células tronco mesenquimais

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.794.214

com anticorpos monoclonais fluorescentes (CDs); exposição das células mesenquimais as proteínas morfogenéticas ósseas; e, avaliar a citomorfologia das células-tronco mesenquimais diferenciadas sob a influência das proteínas morfogenéticas ósseas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador refere riscos relativo aos procedimentos médicos normais durante uma cirurgia de parto Cesáreo. E, que em nenhum momento será realizado quaisquer tipos de procedimentos diretos ou indiretos no corpo da parturiente, além daqueles que, normalmente, ocorrem no parto Cesáreo. Apresenta como proposta para minimizar estes riscos da cirurgia cesariana a realização por profissionais altamente treinados e, em ambiente hospitalar com todos os equipamentos necessários para atender à parturiente caso ocorra algum imprevisto. Considera ainda, como forma de minimizar a ocorrência de eventual constrangimento para a parturiente, que a pesquisadora converse com a mesma antes do parto de forma respeitosa para tranquilizá-la sobre a cirurgia de uma forma geral.

O pesquisador apresenta como benefícios: "Os benefícios consistem no esclarecimento e orientações às parturientes sobre o parto. Indiretamente os resultados da pesquisa poderão ajudar futuramente a compreender melhor as aplicações terapêuticas das células-tronco em humanos"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa para coleta de cordões umbilicais a serem doados voluntariamente por parturientes saudáveis, submetidas à cirurgia Cesariana no Hospital De Ávila. São descritas a técnica de coleta do cordão por secção utilizando pinça hemostática reta e tesoura cirúrgica imediatamente após o parto. A colocação em frasco boro estéril contendo solução fisiológica estéril de tampão fosfato salino (PBS), Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) (2 mM), antibióticos – penicilina (150 UI/ml) e estreptomicina (150 g/mL) e antifúngico- anfotericina B (5 g/ml). A acomodação e o transporte de órgãos em automóvel particular até o Laboratório de Biofísica das Membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov, do Depto de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Biociências da UFPE sendo posteriormente armazenados em geladeira. Estão descritas a forma de processamento, isolamento e cultivo, bem como a caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais, a exposição das células-tronco mesenquimais as proteínas morfogenéticas ósseas e a análise citomorfológica das células diferenciadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta a documentação necessária.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.794.214

Recomendações:

Sem Recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem Pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

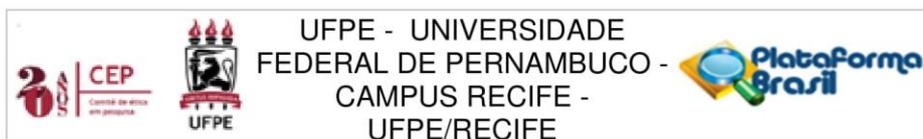
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1462945.pdf	21/12/2019 12:36:53		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_PENDENCIAS_P	21/12/2019	CLAUDIO GABRIEL	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.794.214

Outros	ETO_CELULA_TRONCO_ODONTOLOGIA.pdf	12:26:08	RODRIGUES	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_MODIFICADO_PROJETO_PIBITI_2019_2020.pdf	21/12/2019 11:52:55	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MODIFICADO.pdf	21/12/2019 11:52:33	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CLAUDIO_GABRIELNOVO.pdf	01/11/2019 10:44:23	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CLAUDIO_GABRIEL.pdf	01/11/2019 10:44:05	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Taynara_Souza.pdf	31/10/2019 17:04:30	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Marcia_Silva.pdf	31/10/2019 17:02:46	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Lara_Marques_Moreno.pdf	31/10/2019 17:01:46	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Curriculo_Claudio_Gabriel_Rodrigues.pdf	31/10/2019 16:45:52	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_HOSPITAL_DEAVILA_PROJETO_PIBITI_2019.pdf	31/10/2019 16:40:33	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_CHEFIA_DEPARTAMENTO_PROJETO_PIBITI_2019_2020.pdf	31/10/2019 16:40:12	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_CONF_PROJETO_PIBITI_2019_2020.pdf	31/10/2019 16:39:34	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO_PROJETO_PIBITI_2019_2020.pdf	31/10/2019 16:24:59	CLAUDIO GABRIEL RODRIGUES	Aceito

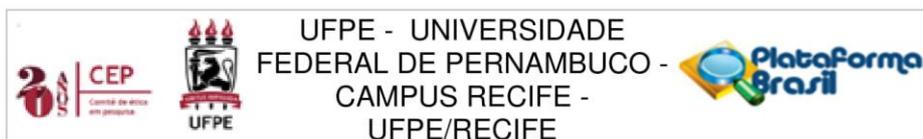
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.794.214

RECIFE, 06 de Janeiro de 2020

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br