



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

ANTÔNIO OSCAR GOMES FILHO

**BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE
BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO BASEADO EM
NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS E PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO**

Recife
2024

ANTÔNIO OSCAR GOMES FILHO

**BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE
BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO BASEADO EM
NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS E PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade.
Coorientador: Maria Danielly Lima de Oliveira.

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gomes Filho, Antônio Oscar.

BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO BASEADO EM NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS E PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO / Antônio Oscar

Gomes Filho. - Recife, 2024.

63 : il., tab.

Orientador(a): César Augusto Souza de Andrade

Coorientador(a): Maria Danielly Lima de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Biossensor. 2. Eletroquímica . 3. Bactérias. 4. Peptídeo antimicrobiano .
5. Nanotubo de carbono. I. Andrade , César Augusto Souza de. (Orientação). II.
Oliveira, Maria Danielly Lima de . (Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)

ANTÔNIO OSCAR GOMES FILHO

**BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE
BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO BASEADO EM
NANOTUBOS DE CARBONO MULTICAMADAS E PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 15/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco / Depto. de Bioquímica

Coorientador: Prof. Dr. Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco / Depto. de Bioquímica

Prof. Ms. Raiza Pereira Santos de Lucena
Universidade Federal de Pernambuco / Depto. de Bioquímica

Prof. Ms. Maria San Miris Lopes de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco / Depto. de Bioquímica

Dedico este trabalho com profundo carinho à minha mãe e a todos os familiares que, com seu amor e apoio incondicional, tornaram possível alcançar este momento significativo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde, força e esperança para alcançar todos os objetivos.

À minha mãe, Ana Maria Alves Gomes (*in memoriam*), sua lembrança me inspira diariamente a ser um ser humano empático e gentil, que vislumbra na educação uma ferramenta de transformação.

À minha família, agradeço pelo apoio e amor: meu pai, Antônio, que me ama à sua maneira; minhas irmãs, Letícia e Nicolle, que torcem pelo meu sucesso. À minha vó Menininha, símbolo de cuidado divino, à tia Lúcia, sempre calma e acolhedora. À tia Dilcéia, em recuperação, agradeço a inspiração em lutar pelos meus objetivos, independentemente das circunstâncias. A todos, a gratidão pelo cuidado, aprendizado e paciência ao longo dos anos.

Ao meu namorado, Diogo Almeida, agradeço por inspirar e motivar diariamente através do amor, preenchendo meus dias de alegria. Sou grato por sua compreensão e apoio constante.

Ao Prof. Dr. César Augusto, meu orientador, agradeço pelos conhecimentos, oportunidades, confiança e disponibilidade durante toda a orientação, proporcionando uma bagagem imensa de conhecimento. À Prof^a. Dr^a. Maria Danielly, minha coorientadora, agradeço o apoio, conhecimento e informações compartilhadas.

Aos colegas do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, em especial, agradeço a Alberto, Sthefany, Heloísa, Brenda, Raiza, San e Bia. Além do conhecimento compartilhado, sou grato pela amizade, conversas e risadas nos anos de Iniciação Científica.

Aos amigos de longa data, Carol, Laura, Renata, Rayanna e Dawyd, agradeço pelos momentos compartilhados. Na graduação, às amigas construídas, como Elias, Fernanda, Laura, Yago, Giovanna, Nilton, Davi, Lucas. E no estágio clínico, agradeço a Mayara e Larissa.

Ao CNPq pelo fomento na pesquisa.

Agradeço à Lady Gaga por suas músicas inspiradoras, que diariamente me incentivam a ser autêntico e orgulhoso da pessoa que me tornei.

E a todos aqueles que eu não citei, mas que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

Obrigado!

**" Se você dedicar sua mente, trabalhar arduamente, nunca desistir, e não dar ouvidos às rejeições, você pode alcançar qualquer coisa que a vida coloque em seu caminho."
(Lady Gaga)**

GOMES FILHO, Antônio Oscar. **Biossensor impedimétrico para detecção de bactérias de interesse clínico baseado em nanotubos de carbono multicamadas e peptídeo antimicrobiano**. 2024. 64 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um sério problema de saúde pública, resultando em milhares de mortes anualmente. O uso indiscriminado de antibióticos contribui para a disseminação de microrganismos resistentes. As abordagens convencionais para a identificação de microrganismos patogênicos, como o cultivo microbiológico, ELISA e técnicas moleculares, enfrentam desafios como reações laboriosas, falsos-positivos e custos elevados de equipamentos e reagentes. Nesse contexto, os biossensores eletroquímicos emergem como uma inovação rápida e econômica na detecção de infecções relacionadas à saúde, utilizando elementos biológicos, como enzimas, ácidos nucleicos e anticorpos para reconhecimento específico. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) destacam-se como biorreceptores altamente eficazes, estabelecendo interações específicas com a parede celular de microrganismos. A amplificação do sinal é alcançada por meio da integração de nanomateriais, como polímeros condutores, nanopartículas e derivados de grafeno, sendo os nanotubos de carbono multicamadas notáveis por suas capacidades únicas de grupamentos carboxílicos e propriedades condutoras. Este estudo apresenta uma plataforma sensora inovadora que utiliza nanotubos de carbono multicamadas eletrodepositados em conjunto com o peptídeo antimicrobiano temporina PTa (T-PTa) para a identificação de bactérias clinicamente relevantes. A eficácia do sistema sensor é evidenciada pela aplicação de técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Foram registrados picos de corrente anódica (ipa) e catódica (ipc), além da resistência à transferência de carga (R_{CT}), para investigar a velocidade de resposta dos elétrons diante das modificações na superfície do eletrodo de ouro. Análises morfológicas por meio de microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), além da análise dos grupos funcionais através da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), demonstraram a incorporação e atividade dos nanomateriais. A camada de nanotubos facilitou a imobilização do peptídeo, devido aos grupos em sua superfície, estabelecendo uma ligação amida-amina presente na estrutura do T-PTa. Além disso, as nanopartículas eletrodepositadas amplificaram a sensibilidade do biossensor, intensificando o sinal detectado. Os resultados da interação com suspensões bacterianas revelaram uma variação crescente no R_{CT} por análise impedimétrica, seguindo concentrações de 10^1 a 10^6 UFC.mL⁻¹. O biossensor demonstrou alta sensibilidade, com um limite de detecção de 10 UFC.mL⁻¹, equivalente a técnicas padrão. Este biossensor representa uma promissora alternativa na identificação de microrganismos clínicos, podendo complementar as técnicas convencionais.

Palavras-chave: Biossensor; Eletroquímica; Bactérias; Peptídeo antimicrobiano; Nanotubo de carbono.

GOMES FILHO, Antonio Oscar. **Impedimetric biosensor for detection of bacteria of clinical interest based on multilayer carbon nanotubes and antimicrobial peptide**. 2024. 64 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Cidade, ano.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) are a serious public health problem, resulting in thousands of deaths annually. The indiscriminate use of antibiotics contributes to the spread of resistant microorganisms. Conventional approaches for identifying pathogenic microorganisms, such as microbiological culturing, ELISA, and molecular techniques, face challenges such as laborious reactions, false positives, and high costs of equipment and reagents. In this context, electrochemical biosensors emerge as a rapid and cost-effective innovation in the detection of healthcare-related infections, utilizing biological elements such as enzymes, nucleic acids, and antibodies for specific recognition. Antimicrobial peptides (AMPs) stand out as highly effective bioreceptors, establishing specific interactions with the cell walls of microorganisms. Signal amplification is achieved through the integration of nanomaterials such as conductive polymers, nanoparticles, and graphene derivatives, with multi-walled carbon nanotubes being notable for their unique carboxylic groupings and conductive properties. This study presents an innovative sensor platform using electro-deposited multi-walled carbon nanotubes in conjunction with the antimicrobial peptide temporin PTa (T-PTa) for the identification of clinically relevant bacteria. The sensor system's effectiveness is demonstrated through electrochemical techniques such as cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Anodic (ipa) and cathodic (ipc) current peaks, as well as charge transfer resistance (R_{CT}), were recorded to investigate the electron response rate to modifications on the gold electrode surface. Morphological analyses through atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), and analysis of functional groups using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) demonstrated the incorporation and activity of nanomaterials. The nanotube layer facilitated peptide immobilization due to the groups on its surface, establishing an amide-amine bond present in the T-PTa structure. Additionally, electro-deposited nanoparticles amplified the biosensor's sensitivity, enhancing the detected signal. Results from the interaction with bacterial suspensions revealed an increasing variation in R_{CT} through impedance analysis, following concentrations from 10^1 to 10^6 CFU/mL. The biosensor demonstrated high sensitivity, with a detection limit of 10 CFU/mL, equivalent to standard techniques. This biosensor represents a promising alternative in identifying clinical microorganisms, potentially complementing conventional techniques.

Keywords: Biosensor. Electrochemistry. Bacteria. Antimicrobial peptide. Carbon nanotube.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais sítios corpóreos suscetíveis a infecções bacterianas	20
Figura 2. Principais técnicas utilizadas para diagnóstico de bactérias de interesse clínico. a) Cultura microbiana b) Coloração de Gram c) Técnicas moleculares d) Testes de sensibilidade.	23
Figura 3. Exposição do mecanismo de operação de um biossensor empregado na detecção de um analito específico	25
Figura 4. Apresentação dos alótropos de carbono	28
Figura 5. Apresentação da interação eletrostática do peptídeo antimicrobiano Temporina-PTa com membrana de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	29
Figura 6. Célula eletroquímica (a) e eletrodo comercial (b) compostos pelo eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e contra eletrodo (CE).	30
Figura 7. Apresentação gráfica de um voltamograma cíclico, indicando os parâmetros: I _{pa} (corrente de pico anódica), I _{pc} (corrente de pico catódica), E _{pa} (potencial de pico anódico) e E _{pc} (potencial de pico catódico).	31
Figura 8. Exibição do gráfico de Nyquist (a) em relação aos componentes do circuito equivalente de Randles (b).	33
Figura 9. Representação esquemática dos componentes das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (a) e da microscopia de força atômica (b).	35
Figura 10. Representação esquemática da plataforma MWCNTs_T-PTa.	40
Figura 11. Imagens 3D (5.0 μm x 5.0 μm) via AFM da topografia do processo de modificação do ET. a) MWCNTs, b) MWCNTs_Pta, c) Pseudomonas aeruginosa d) Staphylococcus aureus.	40
Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura. a) Eletrodo de ouro, b) Eletrodeposição de MWCNTs	42
Figura 13. Caracterização dos grupamentos funcionais da plataforma eletrodepositada com MWCNTs_CTAB através da técnica de FTIR.....	42
Figura 14. Voltograma obtido durante a eletrossíntese de 20 ciclos de (MWCNTs_CTAB) em 0,5 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄ . (E _i : -0,8 V, E _f : +1,2 V, taxa de varredura: 100 mVs ⁻¹).	43
Figura 15. Avaliação voltamétrica do processo de modificação da plataforma sensora. Obtido através do potencial de varredura entre -0.2V a +0.7 com uma taxa de varredura de 50 mV s ⁻¹ na presença de uma solução de 10mM de [Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (1:1).	44
Figura 16. Avaliação impedimétrica do processo de modificação da plataforma sensora. Obtido através da utilização de uma solução de 10mM de [Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (1:1).	45
Figura 17. Identificação de Pseudomonas aeruginosa (a), Escherichia coli (b), Bacillus subtilis (c) e Staphylococcus aureus (d) pelo sistema sensor MWCNTs_CTAB-T-Pta. Obtido através da utilização de uma solução de 10mM de [Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (1:1)	46
Figura 18. Circuito equivalente de Randles	47

Figura 19. ΔR_{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies: P. aeruginosa (preto), E. coli (vermelho), B. Subtilis (azul) e S. aureus (magenta).....	48
Figura 20. A variação percentual na resistência à transferência de cargas ($\Delta R_{CT}\%$) após a exposição a diferentes espécies bacterianas.....	49
Figura 21. A cobertura da camada sensora (θ) após o reconhecimento bacteriano ($10^1 - 10^6$ UFC mL ⁻¹).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles após exposição a distintas. Fonte: Próprio autor (2024).	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica, do inglês “Atomic Force Microscopy”
AMP	Peptídeo antimicrobiano, do inglês “Antimicrobial Peptide”
BGE	Barra de eletrodo de ouro, do inglês “Bare Gold Electrode”
CDL	Capacitância de dupla camada
CE	Contra-eletrodo
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
DCE	Dupla camada elétrica
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica, do inglês “Electrochemistry Impedance Spectroscopy”
ELISA	do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
FTIR	Espectroscopia de Transformada de Fourier, do inglês “Fourier Transform Infrared Spectroscopy”
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
iPA	Corrente de pico anódica
iPC	Corrente de pico catódica
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecções do trato urinário
KCl	Cloreto de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido teicóico
MAM	Monocamadas automontadas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MWCNTs	do inglês “multi walled carbon nanotubes”
NaCl	Cloreto de sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês “Phosphate-buffered saline”
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Q	Carga Elétrica

RCT	Resistência a transferência de carga
RS	Resistência da solução eletrolítica
SAM	Monocamadas automontadas, do inglês "Self-assembled monolayer"
T-PTa	Peptídeo Antimicrobiano Temporina PTa
UFC mL	Unidades formadoras de colônia por mL
VC	Voltametria cíclica
Z	Impedância
ZW	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Contexto histórico das infecções causadas por microrganismos	18
2.2 Infecções Bacterianas	19
2.3 Infecções relacionadas à assistência à saúde	21
2.4 Abordagens convencionais para identificação de microrganismos	22
2.5 Biossensores eletroquímicos	24
2.6 Monocamadas Automontadas	26
2.7 Nanomateriais.....	26
2.7.1 Nanomateriais Baseados em Alótropos de Carbono	27
2.7.2 Nanotubos de Carbono Multicamadas.....	28
2.8 Peptídeos Antimicrobianos.....	28
2.9 Técnicas de Caracterização Eletroquímica	29
2.9.1 Voltametria Cíclica.....	31
2.9.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	32
2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura	33
2.11 Microscopia de Força Atômica	34
2.12 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	35
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. METODOLOGIA	37
4.1 Materiais	37
4.2 Modificação da plataforma sensora com MWCNTs e T-PTa.....	37
4.3 Avaliação da interação bacteriana	38
4.4 Caracterização Topográfica e Morfológica	38
4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	38
4.4.2 Microscopia de Força Atômica	38
4.5 Caracterização dos grupos funcionais.....	38
4.6 Caracterização Eletroquímica	38
5. RESULTADOS OU RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Sensor MWCNTs_T-PTa	40
5.2 Caracterização Topográfica e Morfológica	40
5.2.1 Microscopia de Força Atômica	40
5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	41

5.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	42
5.4	Caracterização Eletroquímica da Plataforma Sensora.....	43
5.5	Performance Analítica do Biossensor	45
6.	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

A disseminação e aumento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes representam um sério problema de ameaça à saúde pública. O acrônimo ESKAPE destaca os patógenos oportunistas mais comuns em infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS), como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* (Ma *et al.*, 2020). Além desses, outros patógenos, como *Enterococcus faecalis* e *Bacillus spp.*, ganham destaque nas infecções alimentares, resultando em elevada mortalidade e aumentando os gastos com tratamento (Enosi Tuipulotu *et al.*, 2021).

As opções convencionais para detecção e quantificação de bactérias geralmente envolvem métodos tradicionais, incluindo semeio de culturas bacterianas, testes bioquímicos e de suscetibilidade a antibióticos. No entanto, esses métodos frequentemente demandam mais de 24 horas para fornecer resultados, comprometendo o tempo de diagnóstico e tratamento (Chen *et al.*, 2018). Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), oferecem alta especificidade e precisão, mas podem gerar falsos-positivos ao amplificar material genético de células não viáveis, além do alto custo associado (Hoyos-Nogués; Gil; Mas-Moruno, 2018). A espectrometria de ionização e dessorção a laser assistida por matriz é uma técnica precisa para identificação de microrganismos, mas sua aplicação clínica é limitada devido ao espectro restrito e à semelhança entre diversas espécies microbianas (Rychert, 2019). Diante desse cenário, a busca por alternativas inovadoras que ofereçam sensibilidade, especificidade e baixo custo é constante, destacando-se a ascensão dos biossensores.

O campo de biossensores está em constante progresso e representa um mercado multidisciplinar avaliado em mais de US\$ 25 bilhões em 2021, prevendo-se alcançar US\$ 37 bilhões até 2026 (Sannegowda, 2021). Uma plataforma biossensora típica envolve um biorreceptor (anticorpos, oligonucleotídeos, enzimas, peptídeos, aptâmeros) com afinidade ao analito, um transdutor físico-químico (amperométrico, impedimétrico, potenciométrico e condutométrico) para converter a interação biorreceptor-analito em um sinal elétrico, e um amplificador junto com sistema e software de análise associado a um computador (Maduraiveeran; Sasidharan;

Ganesan, 2018).

A integração da nanotecnologia com biossensores potencializa a sensibilidade desses dispositivos, visto que nanopartículas melhoram reações eletroquímicas e proporcionam amplificação de sinal (Naresh; Lee, 2021). Os nanotubos de carbono (CNT) são particularmente eficazes, facilitando a transferência de elétrons e podendo fornecer imobilização de moléculas através de aprisionamento físico ou formação de ligações covalentes com grupos carboxílicos em sua superfície (Heydari-Bafrooei,; Ensafi, 2019). Tensoativos iônicos, como o brometo de cetrimônio (CTAB), têm sido empregados para a detecção de biomoléculas, promovendo transferência de carga entre a superfície do eletrodo e os analitos (Abraham *et al.*, 2020).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm se destacado como ferramentas biotecnológicas no combate a microrganismos resistentes, sendo provenientes de mecanismos de defesa de diversas espécies vivas (Pardoux; Boturyn; Roupioz, 2020). O tegumento de anfíbios é uma das fontes mais documentadas de peptídeos antimicrobianos, tais quais bombininas, negrocinas, brevininas, tigerininas, esculentinas e temporinas (Conlon *et al.*, 2008). Temporinas são comumente utilizadas contra bactérias gram-positivas e não possuem ação tóxica contra células eucarióticas. Devido a sua natureza catiônica, elas agem de modo a provocar a lise da membrana citoplasmática de microrganismos (Avitabile *et al.*, 2013).

O presente estudo delinea o desenvolvimento de uma plataforma eletroquímica composta por nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs) e o peptídeo antimicrobiano Temporina-Pta como elemento de biorreconhecimento. A avaliação do sistema, conduzida por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), almeja capacitar a plataforma para identificar e diferenciar amostras bacterianas de importância médica em diversas concentrações. Este avanço tecnológico representa uma contribuição significativa para o campo da detecção microbiológica, oferecendo uma abordagem eficaz e específica para o reconhecimento de microrganismos relevantes em diferentes contextos clínicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTEXTO HISTÓRICO DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR MICRORGANISMOS

Desde a invenção do microscópio por Antoine Philips van Leeuwenhoek no século XVI, que possibilitou a identificação pioneira de microrganismos, os avanços na microscopia têm sido cruciais para os campos da medicina e biologia (Prithvi; S; K, 2020). Essa ferramenta revolucionária permitiu uma compreensão mais profunda da estrutura e comportamento desses organismos microscópicos, impulsionando o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico. Esses avanços têm sido fundamentais para o diagnóstico preciso e eficaz de doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e protozoários, resultando em melhores resultados clínicos e uma abordagem mais direcionada para clínica do paciente (Velez-Hoyos; Jimenez-tobon, 2022).

Ao longo da história, diversos microrganismos causadores de pandemias têm apresentado desafios significativos para a saúde pública. O vírus da gripe, provocou pandemias em 1918, 1957, 1968 e 2009, resultando em impactos de larga escala na saúde global (Akin; Gözel, 2020). O HIV, descoberto na década de 1980, desencadeou uma pandemia global contínua, afetando milhões de indivíduos em todo o mundo. O Ebola, responsável por surtos periódicos na África desde 1976, representa uma ameaça grave devido à sua alta taxa de letalidade, e recentemente, a pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2.

A enfermidade respiratória aguda, causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), surgiu na China no final de 2019 e desde então tem se propagado rapidamente pelo globo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença, denominada COVID-19, como uma emergência de saúde pública de alcance global (Muralidar; Visaga; Sekaran, 2020). Em 20 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou o primeiro relatório de situação da pandemia de COVID-19, indicando 282 casos confirmados em laboratório e 6 óbitos em escala global. Esse número aumentou consideravelmente para 21.294.845 casos confirmados em laboratório e 761.779 óbitos até 16 de agosto de 2020 (Culp, 2020). Na conjuntura pós-pandêmica, os casos confirmados ascenderam a 676.609.955, ao passo que as fatalidades atingiram a marca de 6.881.955 até 10 de

outubro de 2023, quando após três anos de monitoramento contínuo de dados sobre a COVID-19 em todo o mundo, a Universidade Johns Hopkins encerrou as operações do Centro de Recursos do Coronavírus (JOHN HOPKINS UNIVERSITY, 2023).

A pandemia de COVID-19 teve um impacto significativo no Brasil desde o seu início em fevereiro de 2020, com a disseminação generalizada da doença por todo o território nacional. Isso resultou em uma sobrecarga do sistema de saúde, afetando milhões de pessoas (Candido, 2021). Mesmo com as diversas medidas para conter a propagação do vírus, o país enfrentou desafios na gestão da pandemia, com uma resposta política fragmentada, subnotificação de casos e escassez de recursos médicos em algumas regiões (Poz; Levcovitz; Bahia, 2021). Dessa forma, o diagnóstico rápido representa uma estratégia fundamental para retardar a transmissão do vírus e compreender a epidemiologia da COVID-19 (Avelino *et al.*, 2021).

2.2 INFECÇÕES BACTERIANAS

Durante a pandemia, pacientes hospitalizados com COVID-19 foram submetidos a terapia antibiótica empírica para prevenir ou tratar infecções bacterianas secundárias (Lingas, 2022). Esse amplo uso de antibióticos promoveu o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes aos medicamentos. Ademais, a superlotação de hospitais com pacientes de COVID-19 possibilitou a disseminação ampliada de bactérias multirresistentes, enquanto o foco predominante dos laboratórios na detecção do vírus da COVID-19 interrompeu indiretamente a identificação desses microrganismos (Ruiz-Garbajosa; Cantón, 2021).

Os patógenos entéricos podem ser transmitidos entre seres humanos pela rota fecal-oral, tanto por contato direto quanto indireto através de fluidos contaminados, como água superficial, alimentos e objetos inanimados. Isso ocorre principalmente após eventos zoonóticos que desencadeiam a transmissão sustentada de fezes para a boca (de Graaf *et al.*, 2017). Devido a esses mecanismos de transmissão, as Enterobacteriaceae desempenham um papel significativo como uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Kang *et al.*, 2018).

Ademais, *Salmonella spp.* causa salmonelose, uma doença gastrointestinal com sintomas como dor abdominal, diarreia, febre e vômitos, podendo resultar em complicações graves, incluindo bacteremia e infecções sistêmicas. Cepas patogênicas de *Escherichia coli*, como *E. coli* O157:H7, causam doenças transmitidas

por alimentos, incluindo síndrome hemolítica urêmica, além de infecções do trato urinário, gastroenterite e infecções do trato respiratório e sanguíneas (Puligundla; Lim, 2022). *Shigella* provoca disenteria bacilar, com sintomas semelhantes aos da salmonelose (Schnupf; Sansonetti, 2020). *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* são associadas a gastroenterite, enterite terminal, apendicite aguda e linfadenite mesentérica, com febre, dor abdominal e diarreia (Riahi; Ahmadi; Zeinali, 2021). Os principais sítios corpóreos acometidos por infecções bacterianas estão apresentados na imagem (fig.1).

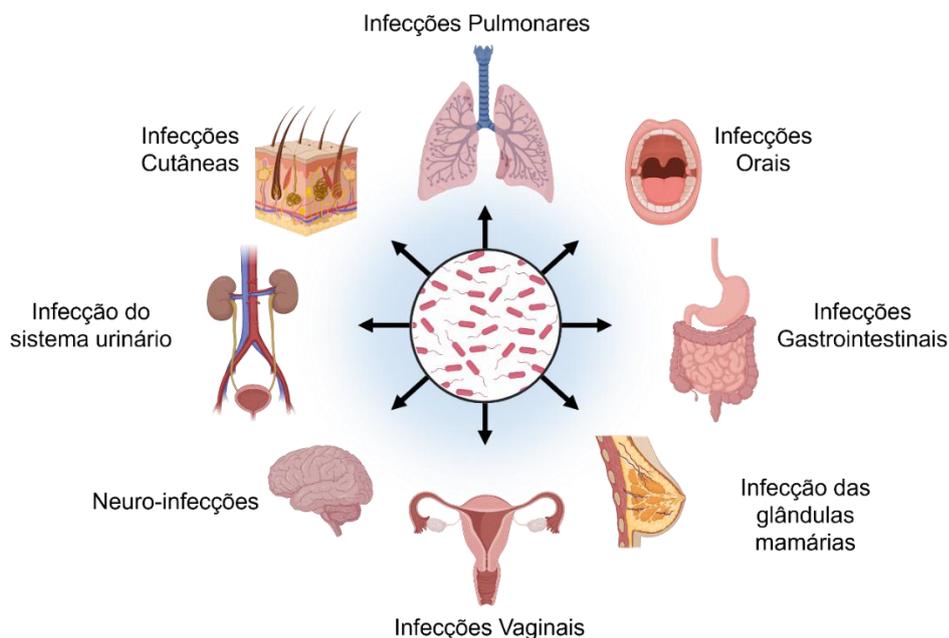


Figura 1. Principais sítios corpóreos suscetíveis a infecções bacterianas. Fonte: Próprio autor (2024).

Os fatores que levam a quadros patológicos relativos à infecção bacteriana resultam de hábitos de higiene inadequados, descuido ambiental e falta de eficácia na sanitização da água. Da mesma forma, a escassez de ferramentas eficientes para detecção e erradicação oportuna de contaminantes também se encontram como problemática, inclusive em países desenvolvidos (Mbuya; Humphrey, 2016).

A contaminação de recursos hídricos por microrganismos em decorrência das mudanças climáticas emerge como uma preocupação cada vez mais premente. À medida que os padrões climáticos se tornam mais extremos, com eventos como chuvas intensas e secas prolongadas se tornando mais frequentes, os ecossistemas aquáticos são afetados em decorrência de variações climáticas: temperatura,

precipitação e elevação do nível do mar (Islam *et al.*, 2018). A contaminação da água para consumo humano por bactérias patogênicas representa uma séria preocupação em termos de saúde pública. A presença desses microrganismos em fontes de água potencialmente expõe a população a uma variedade de infecções oportunistas, destacando infecções hospitalares (IRAS) envolvendo circuitos de água como fonte de contaminantes (Capelletti; Moraes, 2016).

Entre os microrganismos oportunistas comumente relacionados, *Staphylococcus aureus* é reconhecido por sua capacidade de causar uma gama diversificada de infecções, que vão desde infecções cutâneas moderadamente graves até pneumonia fatal e sepse (Cheung; Bae; Otto, 2021). *Pseudomonas aeruginosa* é particularmente preocupante devido à sua resistência a antimicrobianos e formação de biofilme (Azam; Khan, 2019). *Bacillus subtilis*, embora mais comumente encontrado no solo, possuem esporos resistentes ao calor que podem germinar mesmo após períodos muito longos contaminando fontes de água, representando um risco especial para indivíduos imunocomprometidos (Stülke *et al.*, 2023).

2.3 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Outro desafio persistente em saúde pública, tanto para países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, como o Brasil, no século XXI, é a prevalência de infecções hospitalares. As IRAS representam condições infecciosas que se desenvolvem durante o processo de tratamento médico e que não estavam presentes no momento da admissão do paciente na unidade de saúde. Essas complicações infecciosas podem surgir em uma ampla variedade de cenários, abrangendo desde ambientes hospitalares até instalações de cuidados prolongados e clínicas ambulatoriais (Rinke *et al.*, 2020).

As IRAS mais significativas estão diretamente associadas ao uso de dispositivos invasivos, como cateteres centrais, que podem desencadear infecções da corrente sanguínea; cateteres associados ao trato urinário, que aumentam o risco de infecções do trato urinário; ventilação mecânica, vinculada a pneumonias; e procedimentos cirúrgicos, suscetíveis a infecções em locais específicos (Bennett *et al.*, 2018). O impacto dessas infecções se estende ao prolongamento do tempo de tratamento, acarretando custos elevados para os centros de saúde, incluindo

despesas adicionais com o aumento do consumo de medicamentos e a realização de testes (Gozel *et al.*, 2021).

Nos países em desenvolvimento, as limitações financeiras impõem desafios significativos no controle das IRAS. Além dos problemas derivados da prolongada internação do paciente, essas infecções podem ser transmitidas aos familiares por meio de contatos casuais, colocando em risco sua saúde física (Bedir Demirdağ *et al.*, 2021). Essas contaminações não estão restritas a pacientes específicos, afetando qualquer indivíduo, inclusive profissionais de saúde, contribuindo para o aumento da taxa de mortalidade nos hospitais (Vidaković *et al.*, 2020).

Anualmente, nos Estados Unidos da América, cerca de 1,7 milhão de pacientes hospitalizados adquirem IRAS durante o tratamento para outras condições, resultando em mais de 98.000 óbitos, conforme relatado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Sartelli; Mckimm; Bakar, 2018). Essa situação acarreta custos significativos, ultrapassando a marca de U\$ 30 bilhões anualmente (Leoncio *et al.*, 2019). Essas infecções representam uma ameaça significativa à saúde dos pacientes e impõem um impacto considerável nos recursos econômicos. No sul da Europa, nos próximos 10 anos, as Infecções Hospitalares acarretarão aproximadamente 1,4 milhão de dias de ocupação de leitos hospitalares, gerando custos de hospitalização que ultrapassam os €320 milhões (Barmpouni *et al.*, 2023).

No Brasil, as IRAS apresentam uma taxa de incidência de 22,8%, contrastando com países desenvolvidos europeus, onde as taxas são inferiores a 9% (Gomes *et al.*, 2020). A disparidade no número de casos de IRAS entre países em desenvolvimento e desenvolvidos não se limita apenas a diferenças culturais, mas está essencialmente enraizada em fatores econômicos.

Essa disparidade destaca a necessidade contínua de aprimorar as práticas de controle de infecção e prevenção no contexto da assistência à saúde no país. Para isso, abordagens inovadoras surgem como metodologias simples e eficazes, uma vez que métodos tradicionais para identificar bactérias de interesse clínico exigem ambientes especializados, equipes capacitadas e recursos dispendiosos.

2.4 ABORDAGENS CONVENCIONAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Na prática clínica, uma variedade de métodos de diagnóstico é amplamente empregada para identificar e caracterizar microrganismos causadores de doenças.

Estes métodos desempenham um papel crucial na determinação rápida e precisa do agente infeccioso, permitindo que os profissionais de saúde iniciem o tratamento apropriado. A figura 2, apresenta uma seleção dos principais métodos empregados na identificação de microrganismos, classificando-os em categorias como cultura bacteriana, microscopia, testes de sensibilidade a antibióticos e técnicas de biologia molecular.

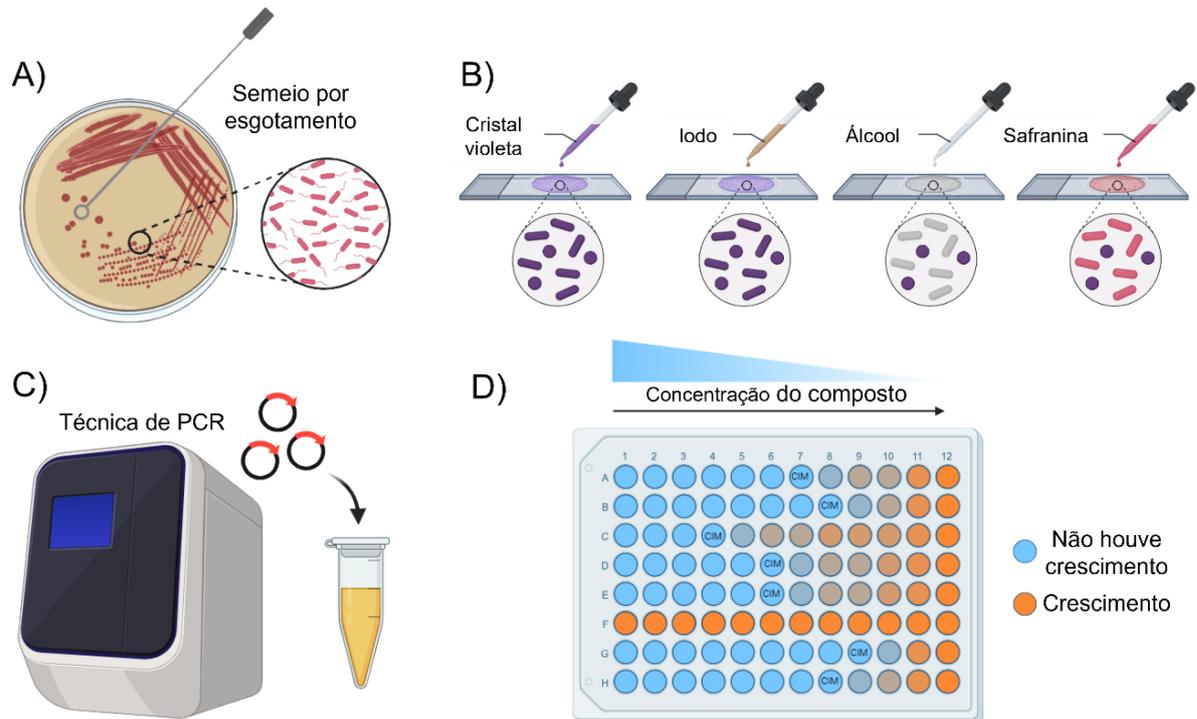


Figura 2. Principais técnicas utilizadas para diagnóstico de bactérias de interesse clínico. a) Cultura microbiana b) Coloração de Gram c) Técnicas moleculares d) Testes de sensibilidade. Fonte: Próprio autor (2024).

A cultura bacteriana é um dos métodos mais antigos e fundamentais para o diagnóstico microbiano. Consiste em semear uma amostra clínica em meios de cultura específicos e incubá-la sob condições favoráveis ao crescimento bacteriano. Após um período adequado, as colônias bacterianas podem ser identificadas e caracterizadas quanto à sua morfologia, padrões de crescimento e bioquímica. No entanto, este método pode ser lento, exigindo vários dias para obtenção de resultados, o que pode atrasar o início do tratamento (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Um procedimento associado à cultura bacteriana é a coloração de Gram, é uma das técnicas de coloração mais cruciais na microbiologia. Seu nome deriva do bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram, que a introduziu pela primeira vez em 1882, principalmente para identificar organismos causadores de pneumonia (Tripathi; Sapa, 2023). Esta técnica baseia-se na composição da parede celular

bacteriana, onde bactérias Gram-positivas são constituídas por uma parede celular espessa de peptidoglicano, conferindo-lhes cor violeta na coloração de Gram, enquanto as Gram-negativas têm uma parede celular mais fina de peptidoglicano, envolvida por uma membrana externa lipídica com lipopolissacarídeos (Vijayakumar *et al.*, 2023). Entretanto, possui suas limitações, como a incapacidade de identificar todas as espécies bacterianas e a possibilidade de resultados variáveis devido a fatores como a idade da cultura, técnicas de preparação inadequadas ou variações na estrutura da parede celular.

Os testes de sensibilidade a antibióticos são frequentemente realizados em conjunto com a cultura bacteriana para determinar quais antibióticos são eficazes contra o agente infeccioso identificado. Estes testes envolvem expor as colônias bacterianas a diferentes antibióticos e observar sua resposta. Além disso, vários sistemas comerciais têm otimizado e parcialmente automatizado o acompanhamento de culturas de Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (AST). Sistemas como Vitek e Microscan realizam medições automatizadas de turbidez para culturas líquidas em múltiplas cavidades (Vasala; Hytönen; Laitinen, 2020). Embora essenciais para guiar o tratamento antimicrobiano, esses testes também têm limitações. Por exemplo, eles podem não refletir a eficácia dos antibióticos *in vivo*, e a interpretação dos resultados pode ser complexa devido a diferentes critérios de sensibilidade adotados por diferentes laboratórios.

As técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), baseada na capacidade da DNA polimerase purificada de sintetizar DNA de fita dupla (dsDNA) *in vitro* a partir de um molde de DNA de fita simples (ssDNA) e um primer de oligonucleotídeo 5', além da sequenciação genômica, revolucionaram o diagnóstico microbiano, permitindo a detecção rápida e específica de DNA ou RNA de patógenos (Schmitz *et al.*, 2022). No entanto, elas também têm suas desvantagens, como o custo elevado, a necessidade de equipamentos especializados e a possibilidade de resultados falsos positivos devido à contaminação cruzada ou amplificação de material genético residual.

2.5 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Um problema crucial no controle de doenças de fácil transmissão é alcançar um método de avaliação rápido, seletivo e específico para a detecção de patógenos.

Os biossensores se mostram como alternativa, uma vez que são dispositivos de análise utilizados para medir e caracterizar uma substância específica, combinando um elemento biológico com um detector físico-químico em sua estrutura para quantificar uma resposta biológica ou bioquímica (Kulkarni; Ayachit; Aminabhavi, 2022).

Os biossensores são compostos por um componente biológico seletivo, responsável por se conectar de maneira específica ao analito-alvo; uma superfície funcional, para imobilização do sistema; um transdutor que converte a interação em um sinal mensurável, e um sistema de detecção para registrar e processar o sinal (Kim *et al.*, 2023). A figura 3 demonstra a integração desses componentes.

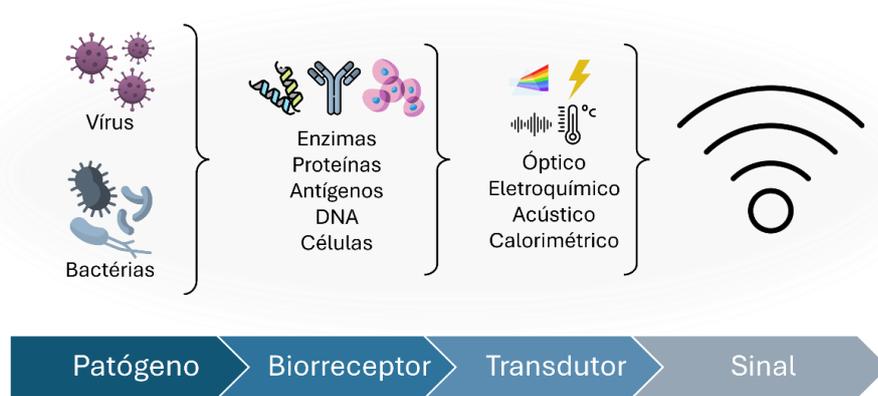


Figura 3. Exposição do mecanismo de operação de um biossensor empregado na detecção de um analito específico. Fonte: Próprio autor (2024).

As saídas transdutoras dos biossensores desempenham um papel crucial na detecção e quantificação de substâncias-alvo. Esses dispositivos geram sinais ópticos ou elétricos, proporcionalmente ao número de interações entre um analito e um biorreceptor. A categorização desses transdutores, com base em seus princípios de operação, abrange transdutores ópticos, térmicos, eletrônicos e gravimétricos (Naresh; Lee, 2021).

Biossensores eletroquímicos constituem uma categoria de dispositivos analíticos que desempenham um papel significativo em várias áreas de aplicação, incluindo saúde, meio ambiente e agricultura (Huang *et al.*, 2017). A metodologia subjacente a esses biossensores envolve a utilização de transdutores eletroquímicos para converter as interações entre o biorreceptor e o analito em sinais elétricos mensuráveis (Ang *et al.*, 2023). Existem diferentes mecanismos de sinal, tais como

voltametria de pulso diferencial (DPV), voltametria cíclica (CV), polarografia, voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria de stripping, voltametria de corrente alternada (ACV) e voltametria de varredura linear (LSV) (Banakar; Hamidi ; Zohaib *et al.*, 2022).

Biorreceptores são elementos fundamentais em sistemas sensores e biomoleculares, desempenhando o papel de reconhecimento específico, como os apresentados no esquema (fig.3). Essas biomoléculas possuem a capacidade única de se ligar seletivamente a seus ligantes, englobando elementos como anticorpos, aptâmeros, DNA, enzimas, células completas, dentre outros componentes (Mittal *et al.*, 2017).

2.6 MONOCAMADAS AUTOMONTADAS

A técnica versátil e eficiente de deposição de filmes finos em substratos sólidos é representada pelas monocamadas automontadas ou SAM (do inglês self-assembled monolayers). Esta abordagem baseia-se na formação espontânea de cadeias moleculares auto-organizadas, onde moléculas precursoras com determinados grupos funcionais são depositadas em substratos sólidos e interagem entre si através de forças intermoleculares (Li *et al.*, 2023). A auto-organização resulta na formação de camadas monomoleculares extremamente homogêneas e ordenadas. Ao incorporar técnicas eletroquímicas no estudo e desenvolvimento de SAM, é possível exercer controle preciso na deposição de camadas moleculares sobre substratos sólidos (Brothers *et al.*, 2020). A abordagem de SAM para a funcionalização de superfícies é amplamente reconhecida pela sua notável versatilidade e eficácia, destacando-se especialmente na imobilização de biomoléculas e nanopartículas, sendo essencial na elaboração de biossensores (Singh; Kaur; Comini, 2020).

2.7 NANOMATERIAIS

Os nanomateriais têm um grande potencial para serem aplicados em biossensores devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas singulares. Uma variedade de nanomateriais, incluindo nanomateriais metálicos, magnéticos, pontos quânticos e outros, têm sido empregados em biossensores. Esses materiais oferecem propriedades únicas que os tornam ideais para aplicações neste campo,

destacando-se pela sensibilidade, seletividade e capacidade de detecção de biomoléculas específicas (Sondhi; Maruf; Stine, 2020). Nanopartículas facilitam a rápida movimentação de íons em biossensores devido à sua elevada área superficial e tamanho reduzido, melhorando sensibilidade e velocidade de resposta. Suas propriedades únicas permitem otimização da condução iônica para detecção precisa e rápida de analitos biomoleculares (Purohit *et al.*, 2020).

2.7.1 Nanomateriais Baseados em Alótropos de Carbono

Nanomateriais baseados em alótropos de carbono têm sido amplamente estudados na utilização para elaboração de biossensores devido à diversidade de formas de carbono, como grafite, fulerenos, diamantes, lonsdaleíta, grafeno, nanorods e nanotubos, como ilustrado na figura 4 (Pirzada; Altintas, 2019). Esses materiais em nanoescala são naturalmente flexíveis e termicamente estáveis, possuindo uma relação peso-resistência superior, juntamente com elevada mobilidade de elétrons (Minhaj Pirzada, 2015). Os grupos funcionais em componentes de carbono desempenham um papel essencial na promoção da biocompatibilidade, tornando esses materiais altamente adequados para aplicações biomédicas. Superfícies modificadas com grupos como hidroxilas e carboxilas facilitam a ligação com moléculas biológicas, como proteínas e enzimas, por meio de interações covalentes ou não covalentes (Díez-Pascual, 2021). Dessa forma, se mostra um componente promissor em virtude das diferentes possibilidades de conjugação.

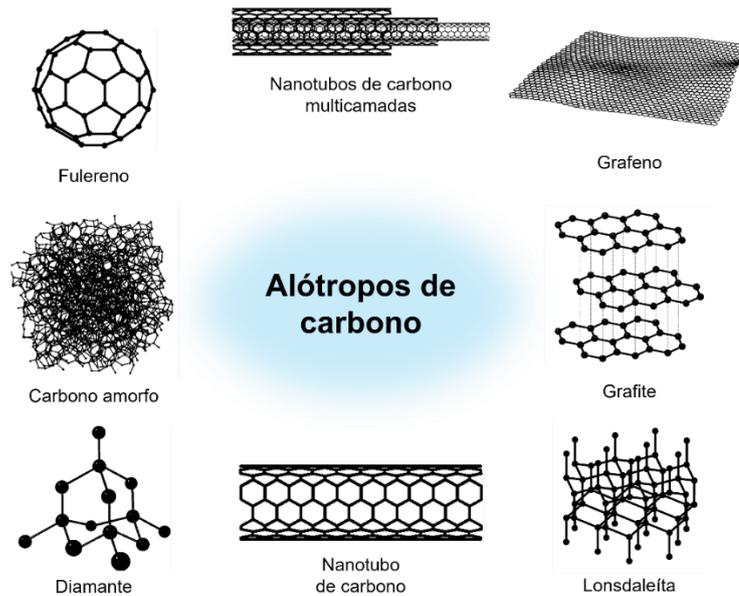


Figura 4. Apresentação dos alótropos de carbono. Fonte: Próprio autor (2024).

2.7.2 Nanotubos de Carbono Multicamadas

Uma dessas possibilidades é o uso de nanotubos de carbono de multicamadas, uma estrutura cilíndrica composta por múltiplas camadas concêntricas de grafeno, uma forma alotrópica de carbono. Cada camada de grafeno é uma folha plana de átomos de carbono organizados em uma estrutura hexagonal. Essas camadas concêntricas conferem aos nanotubos multicamadas uma estrutura tubular em escala nanométrica (Ganji; Kachapi, 2015). As cavidades internas dessas nanopartículas apresentam a notável capacidade de proporcionar uma carga ampliada para diversos agentes terapêuticos e dispositivos de diagnóstico, abrangendo desde fármacos até ácidos nucleicos e proteínas (Tan *et al.*, 2020).

2.8 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos antimicrobianos destacam-se como componentes promissores para o desenvolvimento de biossensores. Estes pequenos fragmentos de proteínas fazem parte do sistema imunológico inato de diversos organismos, exibindo notável especificidade e eficácia na eliminação de uma variedade abrangente de patógenos, que incluem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, vírus, fungos e até mesmo células cancerígenas (Nguyen; Haney; Vogel, 2011).

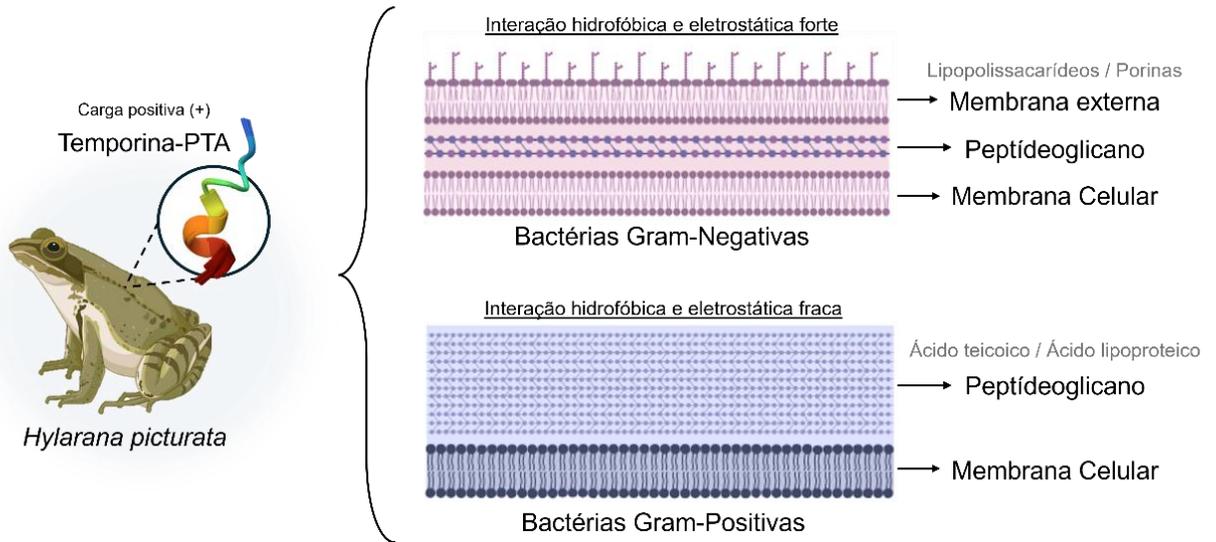


Figura 5. Apresentação da interação eletrostática do peptídeo antimicrobiano Temporina-PTa com membrana de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Fonte: Próprio autor.

Dentre os peptídeos antimicrobianos presentes na pele de anfíbios, as temporinas destacam-se como um grupo de compostos com potencial terapêutico (André *et al.*, 2020). A temporina-PTa em específico, é proveniente da espécie *Hylarana picturata*, caracterizando-se como peptídeos curtos, variando de 8 a 17 resíduos de aminoácidos, cuja região N-terminal é composta por aminoácidos hidrofóbicos, como fenilalanina, leucina e isoleucina. Além disso, os peptídeos similares à temporina geralmente apresentam cargas positivas na faixa de +3 (resíduos de lisina) em suas regiões centrais ou C-terminais. Em ambientes semelhantes a membranas, esses peptídeos podem adotar uma estrutura α -helicoidal, exibindo atividades biológicas contra bactérias, biofilmes, vírus, protozoários e linhagens celulares cancerígenas (Patrícia Souza *et al.*, 2022). Devido à sua carga positiva, esse peptídeo é atraído pelas membranas celulares negativamente carregadas das bactérias, facilitando a adsorção e promovendo danos à integridade da membrana. Essa interação seletiva destaca a eficácia notável desses peptídeos na eliminação e detecção de bactérias (Veizovic *et al.*, 2022).

2.9 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

A avaliação dos biossensores desempenham um papel crucial em seu desenvolvimento. Técnicas eletroquímicas permitem uma resposta rápida e sensível, possibilitando a detecção de substâncias e biomoléculas em níveis extremamente

baixos. A complexidade dos sinais eletroquímicos é notável, apresentando uma variedade considerável que depende dos materiais escolhidos para os eletrodos, destacando o desafio em identificar e classificar esses materiais com base nos sinais eletroquímicos (Deebansok *et al.*, 2024).

A compreensão da cinética eletroquímica é essencial para elucidar processos de oxidação e redução. A interação química entre os componentes imobilizados e os analitos conduz à produção ou consumo de íons ou elétrons, impactando a corrente elétrica, o potencial elétrico e outras propriedades elétricas da solução (González *et al.*, 2016). Esse processo está intimamente ligado ao desempenho dos componentes essenciais de uma célula eletroquímica apresentados na figura 6. O eletrodo de referência desempenha um papel crucial ao fornecer um potencial constante e conhecido, servindo como base para as medições. O contra eletrodo, por sua vez, facilita a transferência de elétrons entre a célula e o circuito externo. Já o eletrodo de trabalho é responsável pela reação eletroquímica de interesse, onde ocorre a conversão de energia química em elétrica (Samar; Bernhard, 2020).

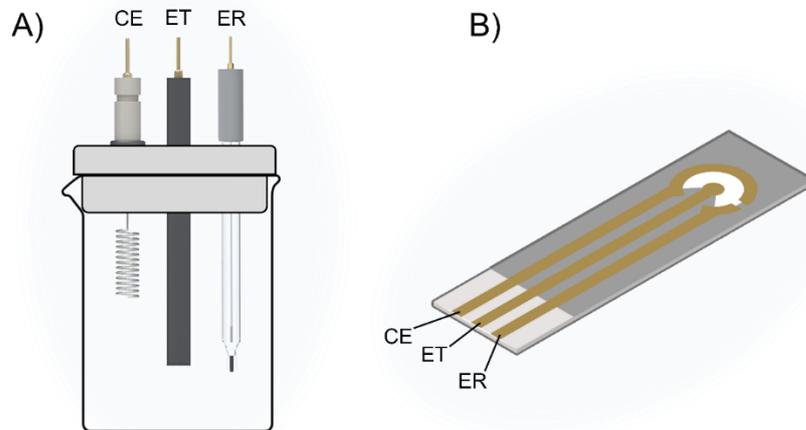


Figura 6. Célula eletroquímica (a) e eletrodo comercial (b) compostos pelo eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e contra eletrodo (CE). Fonte: Próprio autor (2024).

Além das técnicas eletroquímicas, outros métodos de análise também são utilizados para sua validação. A avaliação da morfologia oferece perspectivas valiosas sobre a estrutura e a superfície dessas tecnologias, desempenhando um papel crucial na otimização do reconhecimento molecular (Chauhan; Saxena; Jain, 2022).

Paralelamente, as técnicas ópticas, como a espectroscopia, possibilitam a detecção sensível das interações biomoleculares (Singh *et al.*, 2023).

2.9.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A técnica eletroquímica conhecida como voltametria cíclica (VC) é amplamente utilizada em análises químicas e na investigação de sistemas redox. Descrito primeiramente por Randles em 1948, este método, é baseado na aplicação de uma voltagem a uma célula eletroquímica que é varrida repetidamente, enquanto a corrente elétrica gerada é registrada (Yan; Kawamata; Baran, 2017). O caráter dinâmico dessa célula é evidenciado pela presença de uma corrente elétrica ($I > 0$), que é diretamente relacionada à aplicação controlada da voltagem. Essa abordagem fornece informações valiosas sobre a cinética e termodinâmica de reações eletroquímicas, além de oferecer informações sobre as propriedades de diferentes espécies químicas presentes na solução (Contentin; Fortage; Collomb, 2020). A VC é empregada para investigar os processos de redução e oxidação de espécies moleculares, além de ser inestimável para estudar reações químicas iniciadas por transferência de elétrons, como a catálise. Essa técnica permite não apenas a análise das correntes de pico correspondentes aos processos redox, mas também a determinação de parâmetros cinéticos, como a velocidade de reação e a constante de transferência de carga, fornecendo uma compreensão mais completa dos mecanismos envolvidos (Rossmeisl *et al.*, 2020).

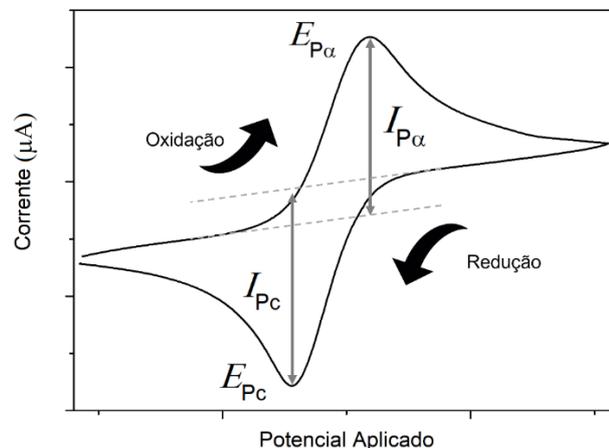


Figura 7. Apresentação gráfica de um voltamograma cíclico, indicando os parâmetros: I_{pa} (corrente de pico anódica), I_{pc} (corrente de pico catódica), E_{pa} (potencial de pico anódico) e E_{pc} (potencial de pico catódico). Fonte: Próprio autor (2024).

Na figura 7, temos o diagrama resultante dessa técnica, onde no eixo x, temos um parâmetro controlado do sistema, neste caso, o potencial aplicado (E), enquanto no eixo y, temos a resposta gerada, representada pela corrente resultante (i). A taxa de varredura refere-se à velocidade com que o potencial aplicado à célula eletroquímica é alterado ao longo do tempo. Essa taxa é representada pela letra grega "u" e é medida em volts por segundo (V/s). Quando falamos em cátodo e ânodo na VC, estamos nos referindo aos dois processos principais que ocorrem durante a varredura do potencial. No cátodo, ocorre a redução de espécies químicas, onde elétrons são ganhos pelo analito. Isso resulta em um aumento na corrente registrada. Por outro lado, no ânodo, ocorre a oxidação das espécies químicas, onde elétrons são perdidos pelo analito. Isso resulta em uma diminuição na corrente registrada. Durante a varredura do potencial, o cátodo e o ânodo alternam-se conforme o potencial é varrido em direção positiva e negativa (Elgrishi *et al.*, 2018).

2.9.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) teve origem entre os anos 1880 e 1900, quando o matemático Oliver Heaviside introduziu o cálculo operacional para resolver equações diferenciais de circuitos elétricos (Ferreira *et al.*, 2023). A EIS fundamenta-se na teoria de sistemas lineares e invariantes no tempo, que exibem comportamentos mais previsíveis em comparação com sistemas não-lineares. Essa técnica possibilita uma análise detalhada das propriedades da interface entre o eletrodo e a solução em estudo (Abdulrahim *et al.*, 2020). Esta abordagem permite uma análise abrangente do comportamento de sistemas complexos, mas com múltiplos processos ocorrendo em taxas diferentes. EIS é uma ferramenta amplamente utilizada em pesquisas que investigam o transporte de elétrons em dispositivos semicondutores e é usada para estudar processos cinéticos eletroquímicos (Pauliukaite *et al.*, 2010).

Essa técnica é vastamente utilizada para medição sistemática da amplitude e fase da impedância superficial de objetos metálicos revestidos em diferentes frequências. Essa abordagem tem como objetivo a avaliação formal da eficácia protetora de um revestimento ou a estabilidade de uma camada de produto de corrosão desenvolvida na superfície metálica (Grassini, 2013).

O circuito de Randles é uma configuração equivalente utilizada para estimar a migração e a redução (ou oxidação) de íons na interface eletrodo-eletrólito, frequentemente utilizado EIS. Os componentes principais incluem uma resistência de solução (R_s), que representa a resistência do eletrólito, uma resistência de transferência de carga (R_{ct}), que modela a resistência associada à transferência de elétrons na interface eletrodo-eletrólito, um elemento de capacitância (C_{dl}), que representa a capacitância dupla formada, e o elemento de Warburg (Z_w), que reflete em frequências mais baixas, o impacto do transporte de massa das espécies eletroativas na impedância (Chen *et al.*, 2019).

O diagrama de Nyquist é uma representação gráfica usada na EIS para analisar sistemas eletroquímicos. Ele consiste em dois eixos: real (Z') e imaginário ($-Z''$). No diagrama de Nyquist, os espectros de impedância exibem uma porção semicircular em frequências altas, indicando o processo que limita a transferência de elétrons. Esse gráfico bidimensional representa a parte real da impedância no eixo x e a parte imaginária no eixo y. O diâmetro dessa semicircunferência reflete a resistência de transferência de carga (R_{ct}) (Tincu *et al.*, 2022).

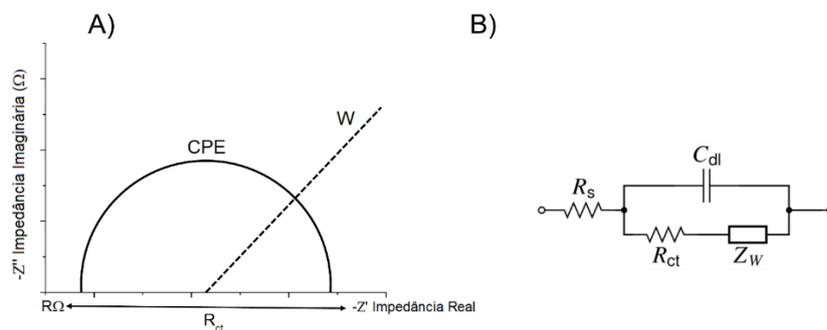


Figura 8. Exibição do gráfico de Nyquist (a) em relação aos componentes do circuito equivalente de Randles (b). Fonte: Próprio autor (2024).

2.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que oferece alta resolução e informações detalhadas da superfície de amostras. Usando um feixe de elétrons focalizado, a MEV escaneia a superfície da amostra e coleta sinais gerados pela interação dos elétrons com os átomos da amostra. Isso permite a obtenção de informações sobre a topografia e composição da superfície em tempo real, com

resolução a partir de menos de 1 nanômetro (NANOSCIENCE INSTRUMENTS, 2018).

A MEV é capaz de analisar uma ampla variedade de materiais sólidos, embora amostras biológicas, como componentes imobilizados em superfícies sensoras, e isolantes, frequentemente necessitam de técnicas especializadas, como baixa voltagem ou vácuo reduzido, para evitar o carregamento da superfície e danos ao feixe (Ogura, 2019).

Detectores de elétrons secundários (SED) e elétrons retroespalhados (BSD) são usados para imagens de alta resolução, enquanto a composição da superfície pode ser analisada usando detectores de espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS). O revestimento de amostras isolantes com uma fina camada de ouro ou platina pode minimizar o carregamento da superfície durante a análise (Martiny; Pinto, 2008).

2.11 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O microscópio de força atômica (AFM) é uma ferramenta essencial na caracterização tridimensional topográfica com uma faixa de centenas de micrômetros a uma resolução sub nanométrica (Xia; Youcef-Toumi, 2022). Sua operação baseia-se no conceito de medir as forças de interação entre uma ponta extremamente afiada, montada em uma estrutura flexível chamada cantilever, e a superfície da amostra. O cantilever atua como uma mola, respondendo às forças de atração ou repulsão entre a ponta e os átomos ou moléculas da superfície. Uma luz laser é refletida na parte traseira do cantilever, e sua deflexão é detectada por meio de um fotodetector, permitindo a obtenção de informações topográficas e mecânicas. A ponta do cantilever é crucial para a obtenção de resultados precisos, sendo fabricada com materiais como silício ou nitreto de silício, e possui uma ponta extremamente fina na escala de alguns átomos, garantindo uma interação sensível com a amostra (Bian *et al.*, 2021).

Ao operar em escalas nanométricas, esta técnica desempenha um papel crucial na avaliação de biossensores devido à sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a topografia e impressões biomecânicas de diferentes componentes de sistemas biológicos ao mapear a distribuição de biomoléculas em uma superfície (Holuigue *et al.*, 2022).

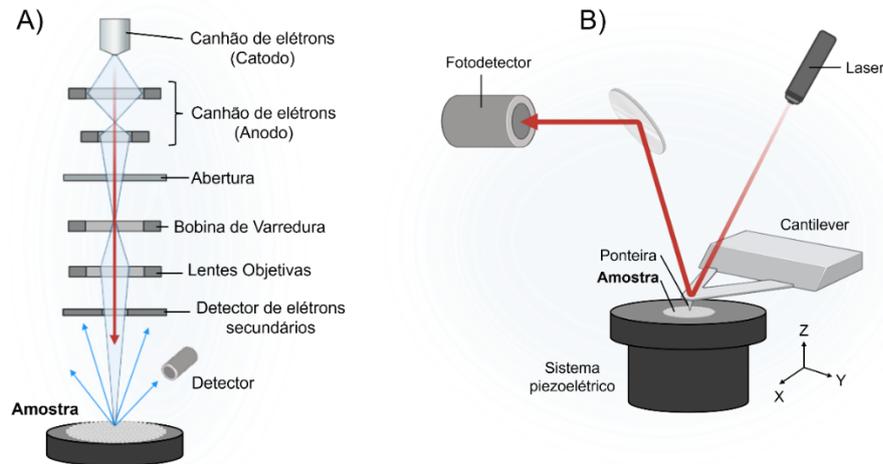


Figura 9. Representação esquemática dos componentes das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (a) e da microscopia de força atômica (b). Fonte: Próprio autor (2024).

2.12 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica usada para identificar e caracterizar materiais com base nas interações moleculares em regiões específicas do espectro infravermelho (Tiernan; Byrne; Kazarian, 2020). O princípio fundamental dessa técnica é baseado na absorção de energia infravermelha por moléculas, que resulta na vibração de suas ligações químicas. Durante uma análise FTIR, o feixe de luz infravermelha é direcionado para a amostra, e as moléculas presentes absorvem a energia em frequências específicas, correspondentes às vibrações de suas ligações químicas. Em seguida, a luz transmitida através da amostra é coletada e processada por meio de um interferômetro de Fourier, que converte os sinais de interferência em um espectro de intensidade de absorção em função do número de onda. Esse espectro, composto por picos de absorção em diferentes regiões do espectro infravermelho, fornece informações sobre a composição química, estrutura molecular e identificação de grupos funcionais presentes na amostra (Țucureanu; Matei; Avram, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma plataforma biossensora nanoestruturada baseada em nanotubos de carbono multicamadas eletrodepositados e no peptídeo antimicrobiano T-PTA para identificar bactérias de interesse clínico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Eletrodeposição dos nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs) na superfície dos eletrodos de trabalho com superfície de ouro, seguido pela imobilização do peptídeo T-PTA;
- Caracterizar a plataforma biossensora por meio das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS);
- Avaliar o comportamento interfacial da capacitância da dupla camada elétrica (CDL), resistência de transferência de carga (R_{CT}), resistência da solução eletrolítica (RS) e impedância de Warburg (ZW) por meio da avaliação dos diagramas de Nyquist e determinação do circuito equivalente de Randles;
- Avaliar o desempenho do biossensor em relação às amostras de diferentes espécies de bactérias por meio de análises eletroquímicas;
- Obter dados estatísticos de desempenho, como reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade;
- Analisar morfologicamente e estruturalmente o sistema sensor antes e após a interação com os microrganismos através da microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

4. METODOLOGIA

Realizou-se uma pesquisa experimental que envolveu o desenvolvimento e a avaliação de um sistema sensor em relação a bactérias de relevância clínica. Foram conduzidas análises qualitativas e quantitativas, juntamente com a aplicação estatística para interpretar os resultados obtidos.

4.1 MATERIAIS

Nanotubos de carbono multicamadas (MWCNTs), brometo de cetrimônio (CTAB), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (EUA). Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram obtidos pela VETEC (Brasil). O peptídeo T-PTa (FFGSVLKILIPKIL-NH₂) foi adquirido pela Aminotech Company. Água deionizada ultrapura foi utilizada em todas as etapas dos experimentos, obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

4.2 MODIFICAÇÃO DA PLATAFORMA SENSORA COM MWCNTs E T-PTA

O eletrodo de trabalho com superfície de ouro ($\phi = 2$ mm) foi lavado em água deionizada, suavemente polido em lixa à base d'água com alumina, e posteriormente submetido a um banho em HClO. Em seguida, o eletrodo foi imerso na solução ácida de MWCNTs para eletrodeposição, onde as nanopartículas foram previamente dispersas por meio de banho ultrassônico (Bolat, 2020). A eletrodeposição foi realizada com a solução MWCNTs_CTAB na faixa de potencial entre -0,8 V e +1,2 V (vs. Ag/AgCl) por 20 ciclos, com uma taxa de varredura de 100 mV s⁻¹. Os agentes acopladores EDC-NHS (0,4 M e 0,1 M, na proporção 1:1) foram aplicados no eletrodo para a conversão do grupo carboxílico e ativação do éster NHS. Por fim, o peptídeo temporina Pta (T-PTa) foi adicionado na concentração de 678 μ M por 30 minutos, e após a lavagem com água deionizada para remoção das moléculas não aderidas.

4.3 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO BACTERIANA

O estudo da interação do biossensor com as amostras bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* foi preparado em diferentes concentrações de UFC.mL⁻¹ (10¹ a 10⁶ UFC.mL⁻¹). O eletrodo funcionalizado foi imerso nas suspensões bacterianas durante 5 minutos, onde, por fim, foi lavado com água deionizada para remoção de células não aderidas e submetido à análise eletroquímica.

4.4 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E MORFOLÓGICA

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise morfológica do biossensor antes e após a interação com o MWCNT foi realizada através de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) TM4000 (Hitachi, Japão), operando com velocidade de aceleração de elétrons de 15kV em temperatura ambiente (24°C ± 1°C).

4.4.2 Microscopia de Força Atômica

A análise morfológica do biossensor antes e após a interação com as bactérias foi realizada através de um microscópio de força atômica (AFM) SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japão). Cantilevers com ponta de silício foram utilizados no modo não-contato, e todos os registros topográficos foram realizados em temperatura ambiente (24°C ± 1°C).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS

A avaliação dos grupamentos funcionais fora realizada através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier do biossensor foram realizadas a 22 °C ± 2 °C usando um espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Rowville, Austrália) com o software Agilent Microlab 5.7.

4.6 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Para a realização da caracterização eletroquímica das camadas e detecção das diferentes espécies de microrganismos, utilizou-se um potenciostato/galvanostato Autolab 128N (Metrohm, Holanda) controlado pelo programa NOVA 1.11. A solução redox de ferro-ferricianeto de potássio (10 mM) foi colocada em uma célula eletroquímica contendo um sistema de três eletrodos: eletrodo de ouro utilizado como eletrodo de trabalho (ET), fio de platina como contra-eletrodo (CE) e prata/cloreto de prata (Ag/AgCl, saturado com KCl 3M) como eletrodo de referência. A voltametria cíclica (VC) foi realizada com potencial entre -0.2V e 0.7 com taxa de varredura de $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Os espectros impedimétricos foram registrados com uma faixa de frequência de 100mHz a 100kHz com amplitude do potencial de onda senoidal de 10 mV.

5. RESULTADOS OU RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SENSOR MWCNTs_T-PTa

A imobilização dos MWCNTs e de T-PTa foi realizada através da modificação da superfície de ouro (BGE), conforme ilustrado no esquema de montagem da plataforma sensora na figura 10.

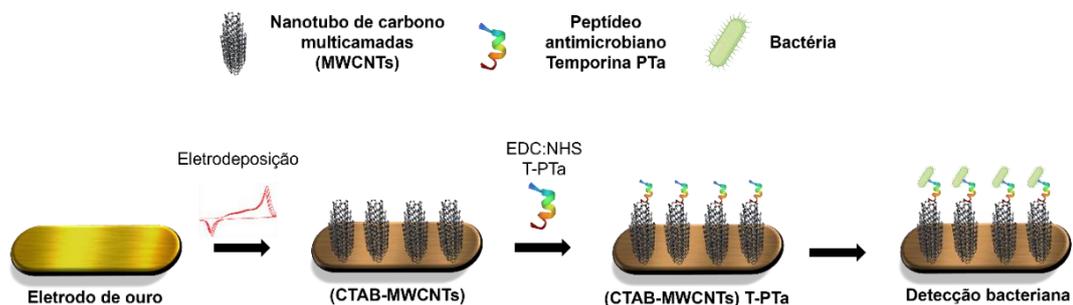


Figura 10. Representação esquemática da plataforma MWCNTs_T-PTa. Fonte: Próprio autor (2023).

5.2 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E MORFOLÓGICA

5.2.1 Microscopia de Força Atômica

As características topográficas do biossensor elaborado foram avaliadas por meio de Microscopia de Força Atômica (AFM), conforme ilustrado na Figura 11. Essa abordagem permitiu a avaliação individual de cada componente imobilizado na plataforma do biossensor, bem como a análise da superfície sensora após a interação com os microrganismos.

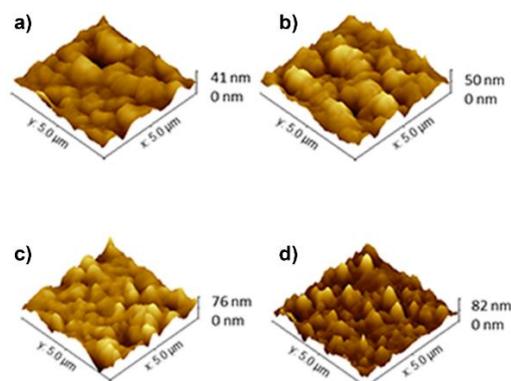


Figura 11. Imagens 3D (5.0 μm x 5.0 μm) via AFM da topografia do processo de modificação do ET. a) MWCNTs, b) MWCNTs_Pta, c) *Pseudomonas aeruginosa* d) *Staphylococcus aureus*. Fonte: Próprio autor (2024).

A disposição vertical dos MWCNTs cria uma matriz tridimensional ordenada, expandindo a área superficial e transformando os MWCNTs em fios condutores. Durante o processo de eletrodeposição dos MWCNTs na superfície do ouro, formou-se uma camada condutora com uma espessura aproximada de 41 nm (Fig. 11a), em conformidade com estudos anteriores, como o trabalho de Chen et al. (Chen *et al.*, 2023). Após a adsorção do peptídeo antimicrobiano T-Pta, observou-se um aumento de 9 nm na altura e uma mudança perceptível na rugosidade do perfil topográfico (Fig. 11b), indicando sua adesão, em concordância com estudos semelhantes, como o trabalho de da Silva-Junio et al (da Silva-Junio *et al.*, 2022).

Quando o sistema interagiu com a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, houve um aumento de 26 nm na rugosidade e no perfil topográfico (Fig. 11c), enquanto a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* apresentou um aumento de 32 nm (Fig. 11d). Essas variações são atribuíveis às características morfológicas das bactérias, onde as Gram-positivas, devido à presença de uma camada espessa de peptidoglicano com 10 a 20 camadas, exibem uma topografia mais acentuada. Além disso, a presença de ácido lipoteicoico (LTA) na parede celular contribui para a complexidade dessa topografia. Em contraste, as bactérias Gram-negativas, com uma camada de peptidoglicano mais fina, geralmente em uma única camada, resultam em uma topografia menos proeminente (Kochan *et al.*, 2018).

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise das características morfológicas da BGE (Figura 12a) e sua subsequente modificação pela eletrodeposição de MWCNTs (Figura 12b) foi conduzida através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A ampliação de 20x com uma aceleração de voltagem de 15kV, utilizada para avaliação das amostras, revela na Figura 12b os MWCNTs sobre a BGE, apresentando uma variedade de formas entrelaçadas de maneira aleatória, criando espaços porosos sutis. Essa configuração evidencia um aumento notável na rugosidade da plataforma, refletindo em um conseqüente incremento da área superficial. Essas características são consistentes com estudos anteriores, como o trabalho de Karim-Nezhad et al. (Karim-Nezhad *et al.*, 2018).

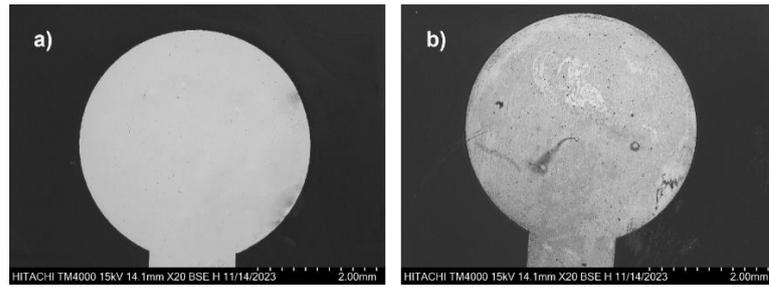


Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura. a) Eletrodo de ouro, b) Eletrodeposição de MWCNTs. Fonte: Próprio autor (2024).

5.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A caracterização dos grupos funcionais por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier é evidenciada na Figura 13. Nela, a configuração dos picos na plataforma é apresentada referente à camada eletrodepositada com MWCNTs_CTAB. Picos em 2916.64 cm^{-1} e 2851.41 cm^{-1} após a modificação, são indicativos de vibrações simétricas e assimétricas, respectivamente, dos grupos metil (CH_3) nas cadeias alquilas do CTAB (Han *et al.*, 2023). O pico em 2081.71 cm^{-1} , localizado em uma região elevada, sugere a presença de grupos funcionais associados a ligações π . Esta característica pode indicar desordem estrutural nos MWCNTs ou a presença de grupos específicos, como nitrilos (Tabatabaei Rezaei *et al.*, 2017). O pico em 1470.43 cm^{-1} , relacionado a vibrações de deformação angular de grupos metil (CH_3) ou grupos metileno (CH_2), reforça a presença das cadeias alquilas do CTAB (Asyiqin Anas *et al.*, 2020). O pico em 909.47 cm^{-1} pode estar relacionado a ligações C-H, indicando a presença de grupos alquil ou características específicas na estrutura dos MWCNTs (Nemoto *et al.*, 2017).

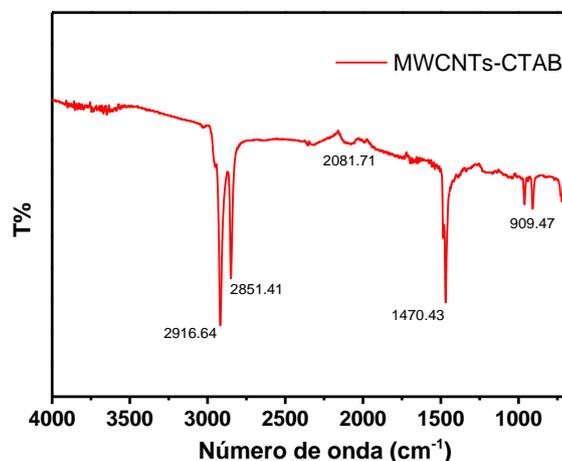


Figura 13. Caracterização dos grupamentos funcionais da plataforma eletrodepositada com MWCNTs_CTAB através da técnica de FTIR. Fonte: Próprio autor (2024).

5.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA SENSORA

A modificação da superfície da BGE por CTAB e MWCNTs em meio ácido (0,5 M H_2SO_4) foi ilustrada na Figura 14. Na primeira varredura, observou-se um pico de oxidação bem definido em +1,0 V (vs. SCE), e na varredura reversa, um pico de redução em +0,5 V (vs. SCE) surgiu no processo de eletrodeposição, conforme destacado no estudo de Bolat (Bolat, 2020). Ao longo das varreduras subsequentes, as respostas de corrente aumentaram progressivamente, culminando na formação de um filme alaranjado após 20 ciclos, indicando claramente a geração do compósito na superfície da BGE. A utilização da molécula surfactante CTAB facilitou a dispersão homogênea de MWCNTs na solução ácida de eletrodeposição, prevenindo aglomeração, uma questão comum em água e na maioria dos solventes orgânicos (Bolat; Yaman; Abaci, 2018).

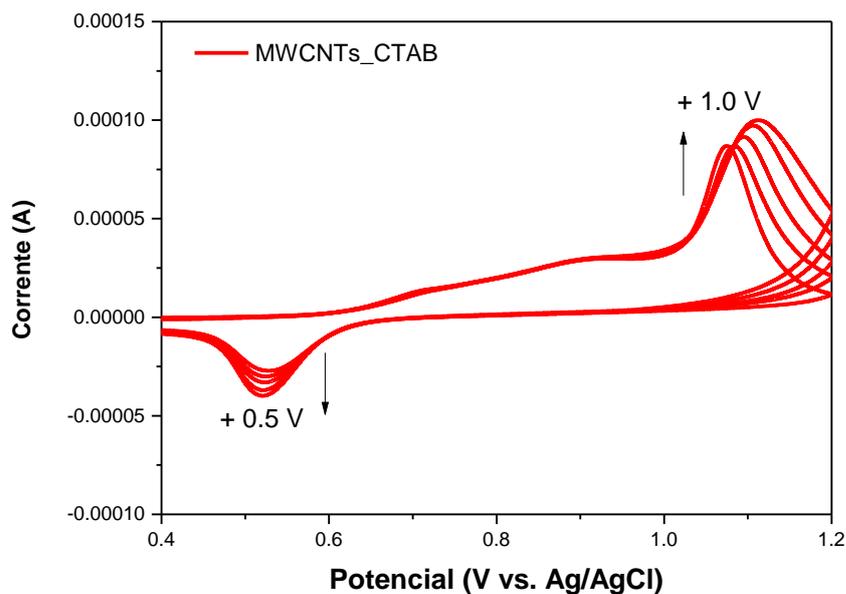


Figura 14. Voltograma obtido durante a eletrossíntese de 20 ciclos de (MWCNTs_CTAB) em 0,5 mol L⁻¹ H_2SO_4 . (Ei: -0,8 V, Ef: +1,2 V, taxa de varredura: 100 mVs⁻¹). Fonte: Próprio autor (2023).

A Figura 15 mostra a caracterização através de voltametria cíclica (VC), correntes associadas aos picos anódicos e catódicos revelaram alterações significativas nos voltamogramas à medida que a BGE passava pelo processo de modificação. O voltamograma representa a superfície de ouro do eletrodo antes da modificação, exibindo uma corrente de pico anódica (i_{PA}) de aproximadamente 33.8

μA . A tendência do aumento dos picos ocorre devido à melhor condutividade elétrica dos componentes do MWCNTs em um efeito de amplificação sinérgica. Este resultado indica que o nanocompósito induz um incremento da área de superfície específica (Congur; Eksin; Erdem, 2019). Entretanto, após a imobilização covalente do T-PTa no MWCNTs, foi observada uma redução da i_{PA} para $15.3 \mu\text{A}$. Os resultados revelaram que o peptídeo de carga negativa foi adsorvido em polímeros catiônicos de MWCNTs_CTAB por meio de interação eletrostática, repelindo íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e impedindo seu acesso à superfície do eletrodo, resultados que se apresentam consistentes com as observações feitas por Aydoğdu Tiğ et al. em sua pesquisa sobre biorreceptores de carga negativa (Tiğ; Zeybek; Pekyardımcı, 2016).

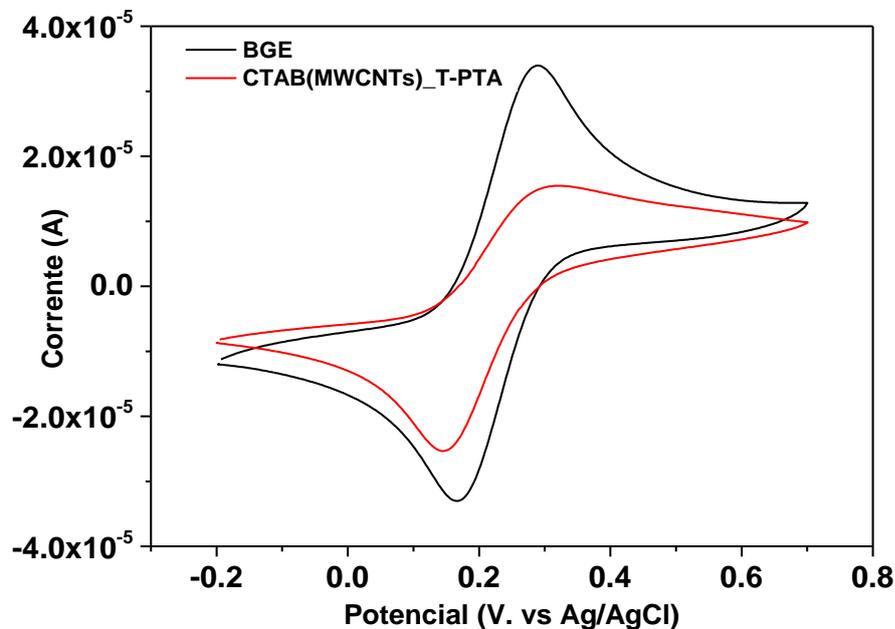


Figura 15. Avaliação voltamétrica do processo de modificação da plataforma sensora. Obtido através do potencial de varredura entre -0.2V a +0.7 com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} na presença de uma solução de 10mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1). Fonte: Próprio autor (2023).

Após as análises realizadas na plataforma sensora, foi notado que leituras consecutivas da VC resultavam na remoção da camada eletrodepositada. Este fenômeno pode ser atribuído à possível ação da varredura cíclica, onde a aplicação repetida de voltagem permite a oxidação e redução sequenciais dos MWCNTs, levando à renovação da BGE. Essa renovação da superfície promove a eliminação de impurezas, resíduos que podem se acumular durante o processo eletroquímico (Stan et al., 2022). Em razão disso, a VC foi empregada exclusivamente na avaliação da

plataforma sensora, sendo deliberadamente evitada na análise do sensor frente amostras bacterianas, uma vez que esta análise comprometia de maneira significativa na integridade da plataforma.

Os Diagramas de Nyquist, registrados pela Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), foram empregados na avaliação do processo de montagem do biossensor e na avaliação frente as amostras bacterianas. Na Figura 16, o eletrodo com superfície limpa ($R_{CT} = 0,101 \text{ k}\Omega$) exibiu um pequeno semicírculo, resultado da difusão do par redox no eletrodo. Após modificação, observou-se um aumento gradual no valor do semicírculo ($R_{CT} = 4,16 \text{ k}\Omega$), sugerindo uma diminuição na capacidade de transferência de elétrons na superfície do eletrodo, indicando o recobrimento do eletrodo pelos MWCNTs_CTAB e T-PTa. Essa redução é principalmente atribuída ao comportamento dielétrico do T-PTa, que cria uma barreira impedindo que íons ferro/ferricianeto alcancem o eletrodo (Guterman; Gazit, 2018).

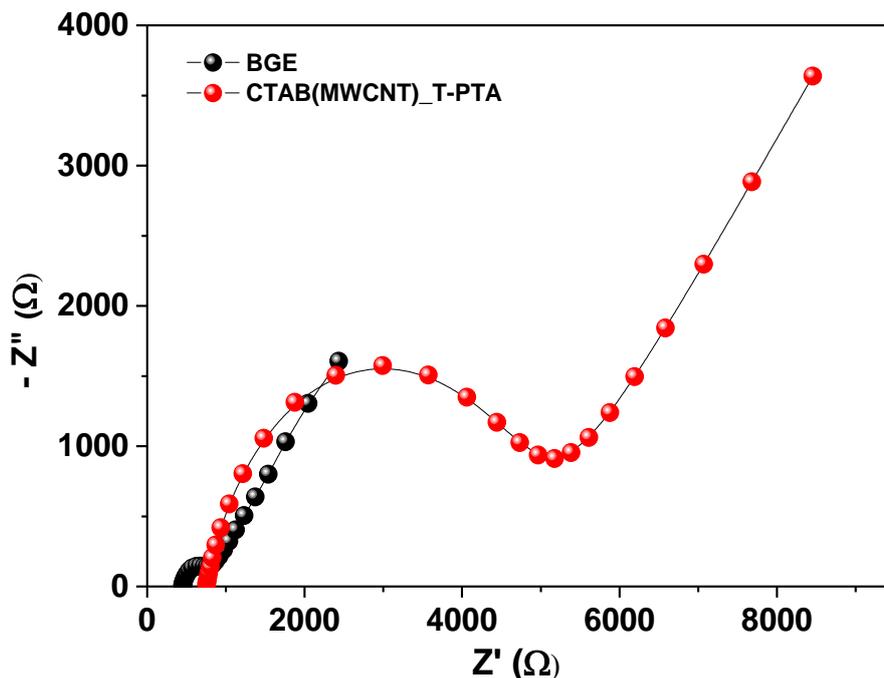


Figura 16. Avaliação impedimétrica do processo de modificação da plataforma sensora. Obtido através da utilização de uma solução de 10mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1). Fonte: Próprio autor (2023).

5.5 PERFORMANCE ANALÍTICA DO BIOSSENSOR

Ao analisarmos os gráficos de impedância de Nyquist apresentados na Figura 17, observamos distinções sutis nos perfis de biorreconhecimento. Há um aumento perceptível na resistência à transferência de cargas, manifestado pelo aumento no diâmetro do semicírculo, especialmente nas bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa* (a) e *E. coli* (b). Trabalhos prévios corroboram com os resultados obtidos neste estudo (da Silva Junior *et al.*, 2022; de Miranda *et al.*, 2017).

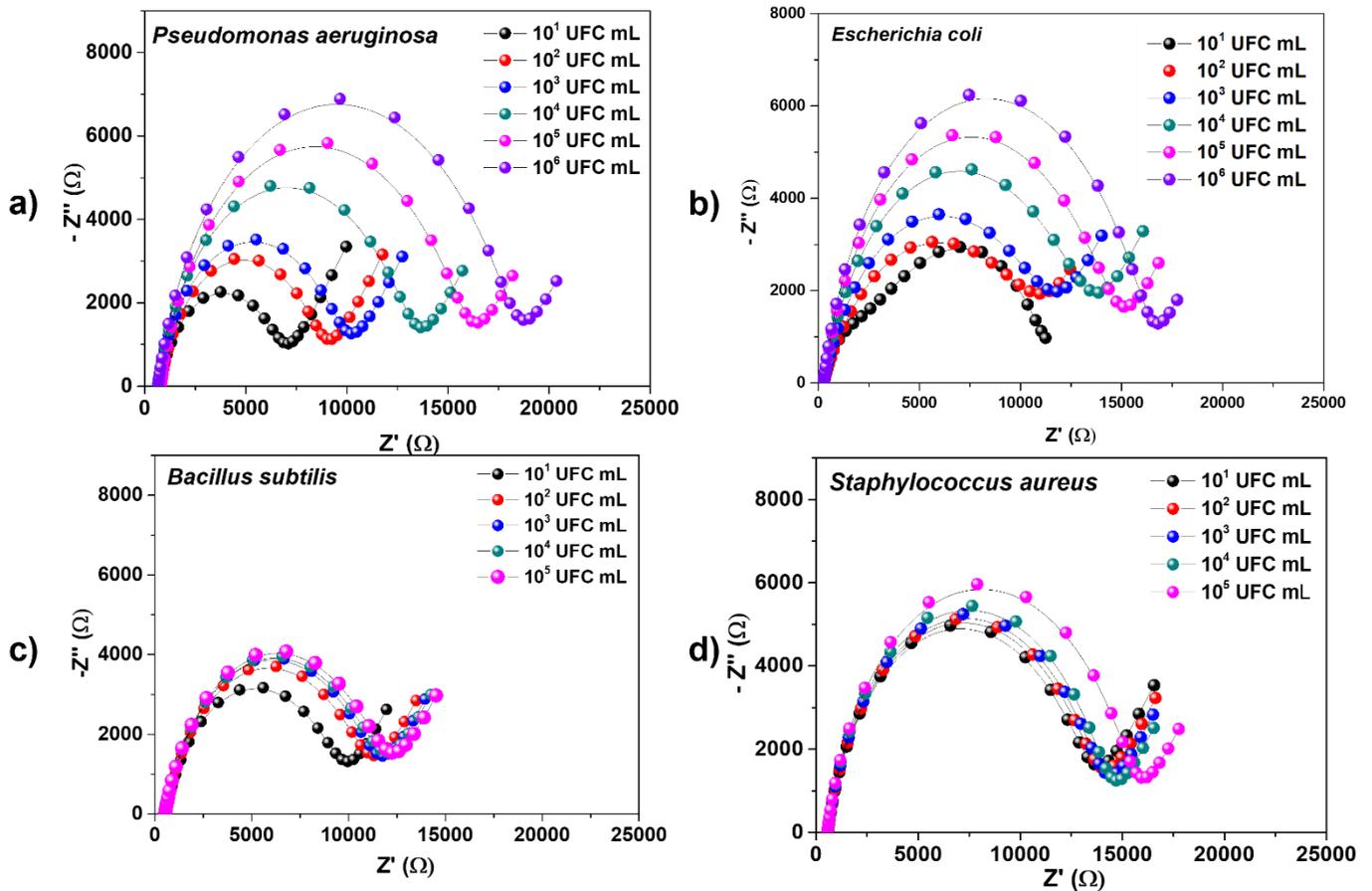


Figura 17. Identificação de *Pseudomonas aeruginosa* (a), *Escherichia coli* (b), *Bacillus subtilis* (c) e *Staphylococcus aureus* (d) pelo sistema sensor MWCNTs_CTAB-T-Pta. Obtido através da utilização de uma solução de 10mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1). Fonte: Próprio autor (2023).

O circuito de Randles foi utilizado para ajustar os dados impedimétricos (Figura 18) para uma avaliação quantitativa dos fenômenos interfaciais na plataforma sensora. Esse circuito inclui a resistência da solução eletrolítica (R_S), o elemento de fase constante (CPE), a resistência à transferência de carga (R_{CT}) e a impedância de Warburg (Z_w). Os valores de R_{CT} e CPE estão diretamente ligados às alterações na interface eletroquímica do eletrodo. Dessa maneira, as mudanças no perfil

impedimétrico da superfície do eletrodo em resposta ao par redox são caracterizadas pelo R_{CT} , que está intimamente associado à massa bacteriana exposta ao biossensor (Andrade *et al.*, 2015). Os valores dos elementos relativos ao circuito da plataforma e das etapas de biorreconhecimento de cada bactéria estão apresentados na Tabela 1.

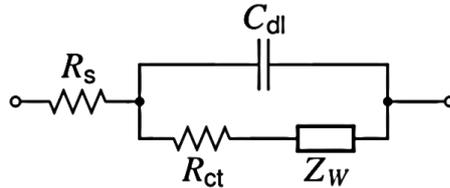


Figura 18. Circuito equivalente de Randles. Fonte: Próprio autor (2024).

Tabela 1. Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles após exposição a distintas. Fonte: Próprio autor (2024).

Eletrodo modificado	UFC mL ⁻¹	R _{ct} (kΩ)	CPE (μF)	R _s (KΩ)	W (μF)
T-PTA	-	4.16	1.49	0.75	0.24
<i>P. aeruginosa</i>	10 ¹	5.96	1.07	0.74	0.26
	10 ²	7.91	0.80	0.79	0.28
	10 ³	9.12	0.87	0.63	0.29
	10 ⁴	12.40	0.76	0.67	0.33
	10 ⁵	15.00	0.71	0.79	0.35
	10 ⁶	17.14	0.64	0.65	0.37
<i>E. coli</i>	10 ¹	10.60	1.94	0.23	0.90
	10 ²	10.80	1.77	0.25	0.43
	10 ³	11.10	1.70	0.25	0.30
	10 ⁴	12.90	1.52	0.25	0.28
	10 ⁵	14.30	1.08	0.26	0.36
	10 ⁶	15.90	0.80	0.27	0.54
<i>B. subtilis</i>	10 ¹	8.99	1.62	0.56	0.35
	10 ²	10.30	1.37	0.53	0.32
	10 ³	10.80	1.19	0.52	0.32
	10 ⁴	11.00	1.26	0.52	0.31
	10 ⁵	11.30	1.20	0.52	0.31
<i>S. aureus</i>	10 ¹	12.60	0.67	0.57	0.25
	10 ²	13.00	0.63	0.57	0.28
	10 ³	13.30	0.59	0.56	0.32
	10 ⁴	13.60	0.52	0.55	0.36
	10 ⁵	14.90	0.50	0.55	0.37

Mesmo após o aumento do R_{CT} frente as diferentes concentrações microbianas de diferentes tipos, a identificação de Gram-negativas em triplicatas se destaca, chegando à identificação de amostras com 10⁶ UFC/mL e concentração. Isso se deve à sua conformação anfílica do AMP, que possui uma superfície policatiônica. O

mecanismo de interação com bactérias Gram-negativas está relacionado ao lipopolissacarídeos (LPS) carregado negativamente, enquanto as bactérias Gram-positivas possuem superfície aniônica devido ao conteúdo de ácido lipoteicoico (LTA) (de Miranda *et al.*, 2017).

Para avaliar a capacidade analítica do biossensor, foi empregada uma curva de calibração fundamentada na variação da resistência à transferência de cargas (ΔR_{CT}). A relação linear entre o R_{CT} % e a concentração do analito é expressa pela seguinte equação:

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT(\text{bact.})} - R_{CT(\text{plataf.})}}{R_{CT(\text{plataf.})}} \times 100$$

Nessa equação, R_{CT} (Bact.) refere-se ao valor de R_{CT} obtido após a exposição às suspensões bacterianas, enquanto R_{CT} (Plataf.) está relacionado ao R_{CT} da plataforma MWCNTs_CTAB quando ocorreu a imobilização do T-PTa. Esses resultados estão representados de forma gráfica na Figura 19.

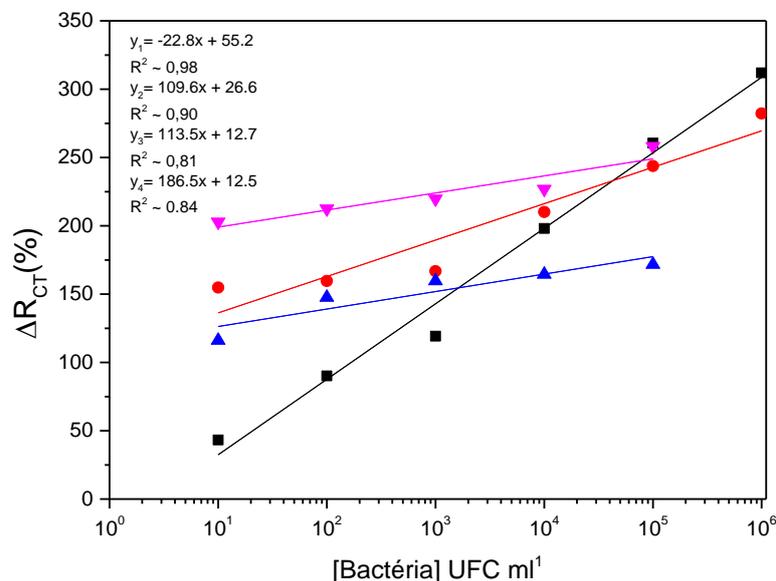


Figura 19. ΔR_{CT} do sistema sensor após exposição a diferentes espécies: *P. aeruginosa* (preto), *E. coli* (vermelho), *B. Subtilis* (azul) e *S. aureus* (magenta). Fonte: Próprio autor (2024).

Conforme evidenciado, observa-se uma relação entre a concentração e o tipo bacteriano analisado. A natureza linear desse perfil de reconhecimento é explicada pela divergência na composição dos componentes bacterianos. Portanto, os valores

de ΔR_{CT} obtidos para o *S. aureus* e *B. Subtilis*, conforme previsto, permaneceram inferiores em comparação com os de *P. aeruginosa* e *E. coli*. Essa distinção é claramente representada ao traçar a reta da curva de calibração, resultando em um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,90. A relação entre ΔR_{CT} e a massa bacteriana, nas três espécies analisadas, é visualmente destacada na Figura 20.

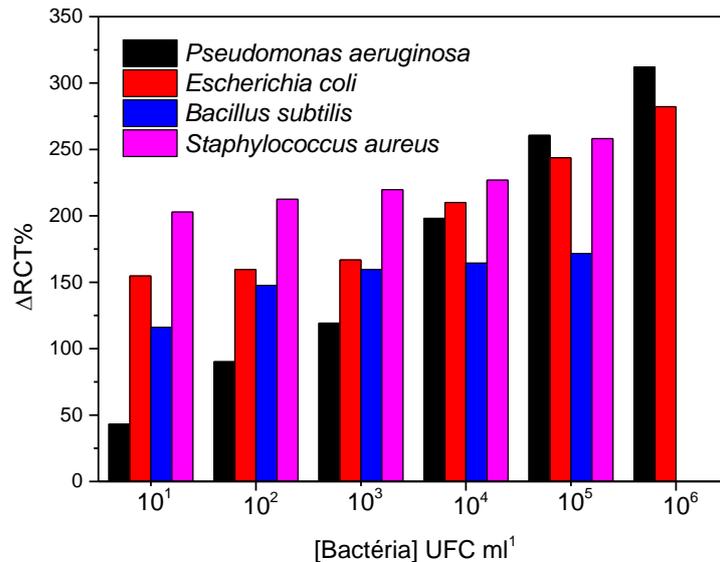


Figura 20. A variação percentual na resistência à transferência de cargas ($\Delta R_{CT}\%$) após a exposição a diferentes espécies bacterianas. Fonte: Próprio autor (2024).

Ao quantificar o recobrimento da camada sensora (θ), podemos avaliar os sítios de ligação ocupados pelas bactérias usando a seguinte equação:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT(plat)}}{R_{CT(bac)}}$$

Onde $R_{CT(plat)}$ se refere à resistência à transferência de cargas (R_{CT}) da plataforma MWCNTs_CTAB-T-PTa, enquanto $R_{CT(bac)}$ corresponde aos valores de R_{CT} após a exposição as amostras bacterianas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 21. Ao examinar o gráfico, observa-se que o aumento de θ está diretamente associado à quantidade de colônias bacterianas expostas, com destaque para um crescimento mais pronunciado nas Gram-negativas. Assim, os valores representados por θ coincidem com os dados obtidos no ΔR_{CT} . Essa observação sugere que o sistema sensor não apenas interage com as células

bacterianas, mas também apresenta respostas específicas de acordo com a composição da parede bacteriana.

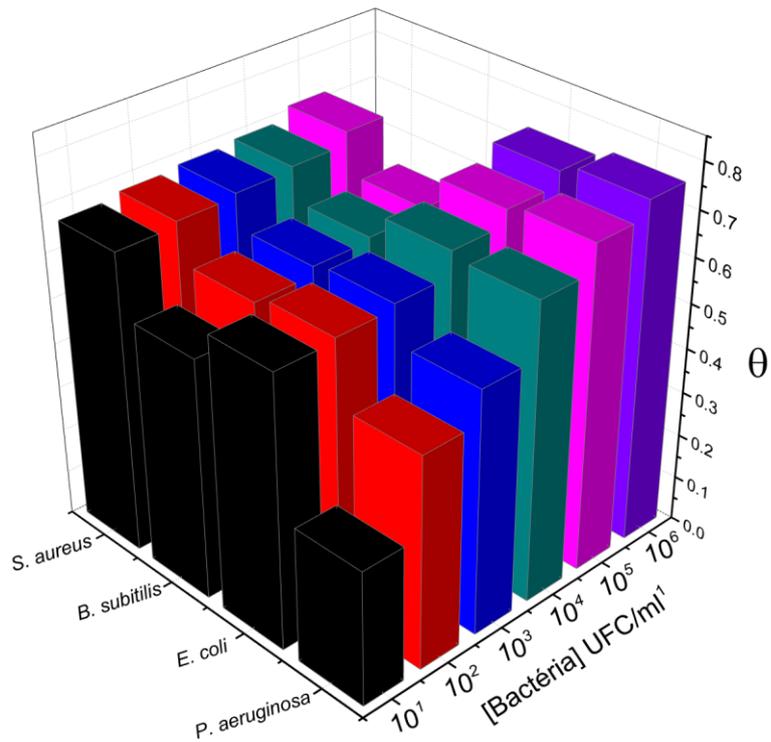


Figura 21. A cobertura da camada sensora (θ) após o reconhecimento bacteriano ($10^1 - 10^6$ UFC mL⁻¹). Fonte: Próprio autor (2024).

6. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida uma plataforma biossensora nanoestruturada utilizando nanotubos de carbono multicamadas eletrodepositados em um eletrodo de superfície de ouro, combinado com o peptídeo antimicrobiano T-PTa. A camada de nanotubos facilitou a imobilização do peptídeo, possuindo grupos carboxílicos livres em sua superfície, permitiu a formação de uma ligação amida com as aminas presentes na estrutura do T-PTa. Além disso, as nanopartículas eletrodepositadas contribuíram para aprimorar a sensibilidade do biossensor, amplificando o sinal detectado. A confirmação da formação da camada sensora no eletrodo foi obtida por análises topográficas e morfológicas, utilizando microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura. A verificação dos grupos funcionais por espectroscopia por transformada de Fourier e as avaliações eletroquímicas, como voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, confirmaram não apenas a montagem bem-sucedida do sistema sensor, mas também sua estabilidade diante de amostras bacterianas. Após testes de interação do biossensor com diferentes suspensões bacterianas, a análise impedimétrica revelou a formação do complexo biossensor-bactéria pela variação da resistência à transferência de carga (R_{CT}). Tal variação se mostrou de forma crescente, seguindo as concentrações de 10^1 a 10^5 UFC.mL⁻¹. Todos os microrganismos, apresentaram limite de detecção de 10 UFC.mL⁻¹, tão sensível quanto técnicas amplamente utilizadas. Ao analisar os cálculos de ΔR_{CT} e θ , foi observada uma correlação linear entre a concentração bacteriana aplicada e a resposta do biossensor, sendo quantitativamente mais expressiva para as cepas Gram-negativas. O biossensor proposto se caracteriza como uma alternativa promissora na identificação de microrganismos de interesse clínico, podendo auxiliar técnicas consideradas padrão ouro. Em perspectiva, os próximos passos deste estudo envolvem uma análise mais aprofundada em amostras clínicas, visando a validação e aplicação prática dos resultados obtidos. Além disso, a investigação seguirá para testes em eletrodos descartáveis/miniaturizados, buscando a viabilidade de implementação em ambientes práticos e de rápida aplicação. Estamos também planejando estender nossos experimentos para incluir testes com outros microrganismos relevantes, a fim de ampliar a aplicabilidade e a compreensão da tecnologia desenvolvida. Esses passos estratégicos são cruciais para consolidar a eficácia e o potencial impacto desta pesquisa em aplicações práticas e clínicas.

REFERÊNCIAS

ABDULRAHIM, Sumayya M. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy analysis of hole transporting material free mesoporous and planar perovskite solar cells. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1–23, 2020.

ABRAHAM, Pinky *et al.* Electrochemical synthesis of thin-layered graphene oxide-poly(CTAB) composite for detection of morphine. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 50, n. 1, p. 41–50, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10800-019-01367-2>.

AKIN, Levent; GÖZEL, Mustafa Gökhan. Understanding dynamics of pandemics. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 50, n. SI-1, p. 515–519, 2020.

ANDRADE, César A.S. *et al.* Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavacin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 833–839, 2015.

ANDRÉ, Sonia *et al.* Functional characterization of temporin-she, a new broad-spectrum antibacterial and leishmanicidal temporin-sh paralog from the sahara frog (*Pelophylax saharicus*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 1–19, 2020.

ANG, Phaik Ching *et al.* Electrochemical biosensor detection on respiratory and flaviviruses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 5–6, p. 1503–1513, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12400-y>.

ASYIQIN ANAS, Nur Ain *et al.* Investigating the properties of cetyltrimethylammonium bromide/hydroxylated graphene quantum dots thin film for potential optical detection of heavy metal ions. **Materials**, v. 13, n. 11, 2020.

AVELINO, Karen Y.P.S. *et al.* Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection. **Journal of Pharmaceutical and**

Biomedical Analysis, v. 206, p. 114392, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114392>.

AVITABILE, Concetta *et al.* Design, structural and functional characterization of a Temporin-1b analog active against Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3767–3775, 2013.

AZAM, Mohd W.; KHAN, Asad U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 350–359, 2019.

BARMPOUNI, Myrto *et al.* Estimating the Clinical and Economic Impact of Introducing a New Antibacterial into Greek Clinical Practice for the Management of Hospital-Acquired Infections with Limited Treatment Options. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 12, n. 2, p. 527–543, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00743-4>.

BEDIR DEMIRDAĞ, Tuğba *et al.* The prevalence and diagnostic criteria of health-care associated infections in neonatal intensive care units in Turkey: A multicenter point-prevalence study. **Pediatrics and Neonatology**, v. 62, n. 2, p. 208–217, 2021.

BENNETT, Erin *et al.* Presence of Invasive Devices and Risks of Healthcare-Associated Infections and Sepsis. **Journal of Pediatric Intensive Care**, v. 07, n. 04, p. 188–195, 2018.

BIAN, Ke *et al.* Scanning probe microscopy. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, 2021.

BOLAT, Gulcin. Investigation of poly(CTAB-MWCNTs) composite based electrochemical DNA biosensor and interaction study with anticancer drug Irinotecan. **Microchemical Journal**, v. 159, n. July, p. 105426, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105426>.

BOLAT, Gulcin; YAMAN, Yesim Tugce; ABACI, Serdar. Highly sensitive electrochemical assay for Bisphenol A detection based on poly (CTAB)/MWCNTs

modified pencil graphite electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 140–148, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.001>.

BROTHERS, Michael C. *et al.* Impact of self-assembled monolayer design and electrochemical factors on impedance-based biosensing. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 8, 2020.

CAPELLETTI, Raquel Vannucci; MORAES, Ângela Maria. Waterborne microorganisms and biofilms related to hospital infections: Strategies for prevention and control in healthcare facilities. **Journal of Water and Health**, v. 14, n. 1, p. 52–67, 2016.

CHAUHAN, Nidhi; SAXENA, Kirti; JAIN, Utkarsh. Single molecule detection; from microscopy to sensors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, n. PA, p. 1389–1401, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.038>.

CHEN, Xiaoqing *et al.* Effect of light and voltage on electrochemical impedance spectroscopy of perovskite solar cells: An empirical approach based on modified randles Circuit. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 7, p. 3968–3978, 2019.

CHEN, Ruiting *et al.* Multi-Walled Carbon Nanotube Array Modified Electrode with 3D Sensing Interface as Electrochemical DNA Biosensor for Multidrug-Resistant Gene Detection. **Biosensors**, v. 13, n. 8, 2023.

CHEN, Ying *et al.* Recent advances in rapid pathogen detection method based on biosensors. 2018.

CHEUNG, Gordon Y.C.; BAE, Justin S.; OTTO, Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>.

CONGUR, Gulsah; EKSIN, Ece; ERDEM, Arzum. Chitosan modified graphite electrodes developed for electrochemical monitoring of interaction between

daunorubicin and DNA. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 22, n. December 2018, p. 100255, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2018.100255>.

CONLON, J. Michael *et al.* Characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the Malaysian frogs, *Odorrana hosii* and *Hylarana picturata* (Anura:Ranidae). **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 465–473, 2008.

COSTENTIN, Cyrille; FORTAGE, Jérôme; COLLOMB, Marie Noëlle. Electrophotocatalysis: Cyclic Voltammetry as an Analytical Tool. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 11, n. 15, p. 6097–6104, 2020.

CULP, William C. Coronavirus Disease 2019: In-Home Isolation Room Construction. **A&A practice**, v. 14, n. 6, p. e01218, 2020.

DA SILVA-JUNIO, Alberto G. *et al.* Electrochemical biosensor based on Temporin-PTA peptide for detection of microorganisms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 216, n. February, 2022.

DA SILVA JUNIOR, Alberto G. *et al.* Electrochemical detection of gram-negative bacteria through mastoparan-capped magnetic nanoparticle. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 160, n. May, 2022.

DAVI, Ferreira; *et al.* Espectroscopia de Impedância Eletroquímica: Princípios Básicos e Algumas Aplicações. **Revista Virtual de Química**, p. 1–17, 2023.

DE GRAAF, Miranda *et al.* Sustained fecal-oral human-to-human transmission following a zoonotic event. **Current Opinion in Virology**, v. 22, n. Figure 1, p. 1–6, 2017.

DE MIRANDA, Juliana L. *et al.* A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 108–114, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.013>.

DEEBANSOK, Siraprapha *et al.* Capacitive tendency concept alongside supervised machine-learning toward classifying electrochemical behavior of battery and pseudocapacitor materials, p. 1–9, 2024.

DÍEZ-PASCUAL, Ana María; Carbon-Based Nanomaterials, 2021.

ELGRISHI, Noémie *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

ENOSI TUIPULOTU, Daniel *et al.* Bacillus cereus: Epidemiology, Virulence Factors, and Host–Pathogen Interactions. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 458–471, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>.

FRANCISCO JOSÉ, Candido dos Reis. Impact of COVID-19 Pandemic on Gynecologic Oncology Surgery in Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, 2021.

FRANCO-DUARTE, Ricardo *et al.* Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, 2019.

GANJI, Davood Domairry; KACHAPI, Sayyid Habibollah Hashemi. **Semi Nonlinear Analysis in Carbon Nanotube**, 2015.

GOMES, André Augusto Guerra *et al.* Infecções relacionadas à assistência em saúde em unidades de terapia intensiva no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 11, p. e4665, 2020.

GONZÁLEZ, Felipe J. *et al.* General Aspects of Redox Chemistry. **Encyclopedia of Physical Organic Chemistry, 5 Volume Set**, p. 1–19, 2016.

GOZEL, Mustafa Gokhan *et al.* National Infection Control Program in Turkey: The healthcare associated infection rate experiences over 10 years. **American Journal of Infection Control**, v. 49, n. 7, p. 885–892, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.12.013>.

GRASSINI, S. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for the in-situ analysis of metallic heritage artefacts. **Corrosion and Conservation of Cultural Heritage Metallic Artefacts**, p. 347–367, 2013.

GUTERMAN, Tom; GAZIT, Ehud. Toward peptide-based bioelectronics: reductionist design of conductive pili mimetics. **Bioelectronics in Medicine**, v. 1, n. 2, p. 131–137, 2018.

HAN, Jia Jun *et al.* Preparation of a highly sensitive and selective modified electrode for imidacloprid determination based on a nanocomposite cetyltrimethylammonium bromide–functionalized graphene oxide/multi-walled carbon nanotubes. **Ionics**, v. 29, n. 1, p. 399–410, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11581-022-04822-x>.

HEYDARI-BAFROOEI, Esmail; ENSAFI, Ali A. Typically used carbon-based nanomaterials in the fabrication of biosensors. *In*: **ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS**. Elsevier Inc., 2019. p. 77–98.

HOLUIGUE, Hatice *et al.* Force Sensing on Cells and Tissues by Atomic Force Microscopy. **Sensors**, v. 22, n. 6, p. 1–17, 2022.

HOYOS-NOGUÉS, Mireia; GIL, F. J.; MAS-MORUNO, Carlos. Antimicrobial peptides: Powerful biorecognition elements to detect bacteria in biosensing technologies. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–24, 2018.

HUANG, Ying *et al.* Disease-related detection with electrochemical biosensors: A review. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 1–30, 2017.

ISLAM, M. M.Majedul *et al.* Modelling the impact of future socio-economic and climate change scenarios on river microbial water quality. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 221, n. 2, p. 283–292, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.11.006>.

KANG, Eugene *et al.* Enterobacteria and host resistance to infection. **Mammalian Genome**, v. 29, n. 7–8, p. 558–576, 2018. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1007/s00335-018-9749-4>.

KARIM-NEZHAD, Ghasem *et al.* Electrochemical analysis of tryptophan using a nanostructuring electrode with multi-walled carbon nanotubes and cetyltrimethylammonium bromide nanocomposite. **Journal of Nanostructures**, v. 8, n. 3, p. 266–275, 2018.

KIM, Eun Ryung *et al.* Biosensors for healthcare: current and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 374–395, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.005>.

KOCHAN, Kamila *et al.* In vivo atomic force microscopy-infrared spectroscopy of bacteria. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, n. 140, 2018.

KULKARNI, Madhusudan B.; AYACHIT, Narasimha H.; AMINABHAVI, Tejraj M. Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. **Biosensors**, v. 12, n. 7, 2022.

LEONCIO, Jackeline Martins *et al.* Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde nos custos da hospitalização de crianças. p. 1–8, 2019.

LI, Mingliang *et al.* Self-assembled monolayers as emerging hole-selective layers enable high-performance thin-film solar cells. **Innovation**, v. 4, n. 1, p. 100369, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100369>.

LINGAS, Elvina C. Empiric Antibiotics in COVID 19: A Narrative Review. **Cureus**, v. 14, n. 6, p. 2–7, 2022.

MA, Yu-xuan *et al.* Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections, v. 1901872, 2020.

MADURAIVEERAN, Govindhan; SASIDHARAN, Manickam; GANESAN, Vellaichamy. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, n.

December 2017, p. 113–129, 2018.

MARTINY, Andrea; PINTO, André Luiz. Aplicação da Microscopia Eletrônica de Varredura à Análise de Resíduos de Tiro. **Handbook of Pediatric Retinal OCT and the Eye-Brain Connection**, p. 24–35, 2008.

MBUYA, Mduduzi N.N.; HUMPHREY, Jean H. Preventing environmental enteric dysfunction through improved water, sanitation and hygiene: An opportunity for stunting reduction in developing countries. **Maternal and Child Nutrition**, v. 12, p. 106–120, 2016.

MINHAJ PIRZADA, Muqsit. Recent Trends and Modifications in Glass Fibre Composites-A Review. **International Journal of Materials and Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 117–122, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/325599957>.

MITTAL, Sunil *et al.* Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 217–231, 2017.

MORTEZA, BANAKAR; MASOUD, HAMIDI ; ZOHAIB, Khurshid; *et al.* Electrochemical Biosensors for Pathogen Detection: An Updated Review. 2022.

MURALIDAR, Shibi; VISAGA, Senthil; SEKARAN, Saravanan. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information, n. January, 2020.

NANOSCIENCE INSTRUMENTS, 2018.

NARESH, Varnakavi; LEE, Nohyun. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors (Switzerland)**, v. 21, n. 4, p. 1–35, 2021.

NEMOTO, Shimpei *et al.* Simple introduction of carboxyl head group with alkyl spacer onto multiwalled carbon nanotubes by solution plasma process. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 56, n. 9, p. 1–6, 2017.

NGUYEN, Leonard T.; HANEY, Evan F.; VOGEL, Hans J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.

NISHANT TRIPATHI; AMIT SAPRA. **Gram Staining**, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>. Acesso em: 7 fev. 2024.

OGURA, Toshihiko. Direct observation of unstained biological samples in water using newly developed impedance scanning electron microscopy. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, p. 1–17, 2019.

PARDOUX, Éric; BOTURYN, Didier; ROUPIOZ, Yoann. Antimicrobial peptides as probes in biosensors detecting whole bacteria: A review. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1–20, 2020.

PATRÍCIA SOUZA, e Silva; *et al.* Synthetic peptides bioinspired in temporin-PTa with antibacterial and antibiofilm activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 100, n. 1, p. 51–63, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/cbdd.14052>.

PAULIUKAITE, Rasa *et al.* Electrochemical impedance studies of chitosan-modified electrodes for application in electrochemical sensors and biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 21, p. 6239–6247, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2009.09.055>.

PIRZADA, Muqsit; ALTINTAS, Zeynep. Nanomaterials for healthcare biosensing applications. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 23, 2019.

POZ, Mario R Dal; LEVCOVITZ, Eduardo; BAHIA, Ligia. Brazil ' s Fight Against. **Am J**

Public Health, v. 111 (03), p. 390–391, 2021.

PRITHVI, Chandrakanth; S, Chandrakanth; K. Smartphone-based intraocular lens microscope. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2020.

PULIGUNDLA, Pradeep; LIM, Seokwon. Biocontrol Approaches against *Escherichia coli* O157:H7 in Foods. **Foods**, v. 11, n. 5, 2022.

PUROHIT, Buddhadev *et al.* Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. **Sensors International**, v. 1, n. July, p. 100040, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>.

RIAHI, Seyed Mohammad; AHMADI, Ehsan; ZEINALI, Tayebbeh. Global Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in Cases of Gastroenteritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, 2021.

RINKE, Michael L. *et al.* Costs of ambulatory pediatric healthcare-associated infections: Central-line-associated bloodstream infection (CLABSIs), catheter-associated urinary tract infection (CAUTIs), and surgical site infections (SSIs). **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 11, p. 1292–1297, 2020.

ROSSMEISL, Jan *et al.* Realistic Cyclic Voltammograms from Ab Initio Simulations in Alkaline and Acidic Electrolytes. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 124, n. 37, p. 20055–20065, 2020.

RUIZ-GARBAJOSA, Patricia; CANTÓN, Rafael. Covid-19: Impact on prescribing and antimicrobial resistance. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v. 34, p. 63–68, 2021.

RYCHERT, Jenna. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. **Journal of Infectiology**, v. 2, n. 4, p. 1–5, 2019.

SAMAR, Damiati;; BERNHARD, Schuster. Electrochemical biosensors based on S-Layer Proteins. **Sensors**, 2020.

SANNEGOWDA, Lokesh Koodlur. Metal nanoparticles for electrochemical sensing applications. **Handbook of Nanomaterials for Sensing Applications**, p. 589–629, 2021.

SARTELLI, Massimo; MCKIMM, Judy; BAKAR, Muhamad Abu. Health care-associated infections – an overview. p. 2321–2333, 2018.

SCHMITZ, Jonathan E. *et al.* Forty Years of Molecular Diagnostics for Infectious Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 10, 2022.

SCHNUPF, Pamela; SANSONETTI, Philippe J. Shigella pathogenesis: New insights through advanced methodologies. **Bacteria and Intracellularly**, n. 4, p. 15–39, 2020.

SINGH, Amit Kumar *et al.* Optical biosensors: a decade in review. **Alexandria Engineering Journal**, v. 67, p. 673–691, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>.

SINGH, Mandeep; KAUR, Navpreet; COMINI, Elisabetta. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, n. 12, p. 3938–3955, 2020.

SONDHI, Palak; MARUF, Md Helal Uddin; STINE, Keith J. Nanomaterials for biosensing lipopolysaccharide. **Biosensors**, v. 10, n. 1, 2020.

STAN, Dana *et al.* What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes?. **Processes**, v. 10, n. 4, 2022.

STÜLKE, Jörg *et al.* Bacillus subtilis, a Swiss Army Knife in Science and Biotechnology. **Journal of Bacteriology**, v. 205, n. 5, p. 1–15, 2023.

TABATABAEI REZAEI, Seyed Jamal *et al.* Chemoselective Reduction of Nitro and Nitrile Compounds with Magnetic Carbon Nanotubes-Supported Pt(II) Catalyst under Mild Conditions. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 43, p. 12256–12266, 2017.

TAN, Julia Meihua *et al.* Preparation, characterisation and biological evaluation of biopolymer-coated multi-walled carbon nanotubes for sustained-delivery of silibinin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73963-8>.

TIERNAN, Hannah; BYRNE, Bernadette; KAZARIAN, Sergei G. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 241, 2020.

TIĞ, Gözde Aydoğdu; ZEYBEK, Bülent; PEKYARDIMCI, Şule. Electrochemical DNA biosensor based on poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) modified glassy carbon electrode for the determination of anticancer drug gemcitabine. **Talanta**, v. 154, p. 312–321, 2016.

TINCU, Bianca *et al.* Vertical Graphene-Based Biosensor for Tumor Cell Dielectric Signature Evaluation. **Micromachines**, v. 13, n. 10, 2022.

ȚUCUREANU, Vasilica; MATEI, Alina; AVRAM, Andrei Marius. FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 502–520, 2016.

UNIVERSITY, JOHN HOPKINS. **No Title**. 2023. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acesso em: 21 fev. 2024.

VASALA, Antti; HYTÖNEN, Vesa P.; LAITINEN, Olli H. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. July, 2020.

VEJZOVIC, Djenana *et al.* Where Electrostatics Matter: Bacterial Surface Neutralization and Membrane Disruption by Antimicrobial Peptides SAAP-148 and OP-145. **Biomolecules**, v. 12, n. 9, 2022.

VELEZ-HOYOS, Alejandro; JIMENEZ-TOBON, Guillermo A. Highlights of infectious

agents in tissue. **Pathology**, v. 54, n. 2, p. 217–224, 2022.

VIDAKOVIĆ, Stefan *et al.* Risk factors for healthcare associated infections and in-hospital mortality in a neurological intensive care unit in a tertiary hospital in Belgrade, Serbia: A prospective cohort study. **Vojnosanitetski Pregled**, v. 77, n. 10, p. 1060–1066, 2020.

VIJAYAKUMAR, Tharani *et al.* Diagnostic Utility of Gram Stain for Oral Smears – A Review. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 11, n. 3, p. 130–134, 2023.

XIA, Fangzhou; YOUCEF-TOUMI, Kamal. Review: Advanced Atomic Force Microscopy Modes for Biomedical Research. **Biosensors**, v. 12, n. 12, p. 1–24, 2022.

YAN, Ming; KAWAMATA, Yu; BARAN, Phil S. Synthetic Organic Electrochemical Methods since 2000: On the Verge of a Renaissance. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 21, p. 13230–13319, 2017.