



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

WINNE FERNANDA SOUTO MAIOR DA SILVA

BIOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO EM PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO Hp-MAP1 E NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETECÇÃO
DE BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO

Recife
2024

WINNE FERNANDA SOUTO MAIOR DA SILVA

**BIOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO EM PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO Hp-MAP1 E NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETECÇÃO
DE BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e insumos Essenciais para a Saúde

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Danielly Lima de Oliveira

Recife
2024

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Silva, Winne Fernanda Souto Maior da.

Biossensor nanoestruturado baseado em peptídeo antimicrobiano Hp-MAP1 e nanotubos de carbono para detecção de bactérias de interesse clínico. / Winne Fernanda Souto Maior da Silva. – 2024.

116 f. : il., fig.; tab.

Orientador: César Augusto Souza de Andrade.

Coorientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências, apêndice.

1. Biossensor. 2. Peptídeo antimicrobiano. 3. Eletroquímica. 4. Bactérias. 5. Nanotecnologia. 6. Nanomateriais. I. Andrade, César Augusto Souza de (Orient.) . II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (Coorient.). III. Título.

WINNE FERNANDA SOUTO MAIOR DA SILVA

**BIOSSENSOR NANOESTRUTURADO BASEADO EM PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO Hp-MAP1 E NANOTUBOS DE CARBONO PARA DETECÇÃO
DE BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico Ciências Biológicas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos essenciais para a Saúde.

Aprovada em: 26/06/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Orientador)
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica - UFPE

Prof^a. Dr^a. Maria Danielly de Oliveira (Coorientadora)
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica - UFPE

Dr. Alberto Galdino da Silva Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, a quem tudo governa. Ao meu marido, meus pais e amigos os quais foram essenciais nesta jornada. A minha persistência e disciplina que foram minhas companhias durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primordialmente a Deus, meu Pai, Guia e Protetor, por todas as bênçãos e livramentos diários, por ser minha fonte de esperança e resiliência. Torno-me a minha melhor versão a cada dia graças às tuas bênçãos e permissões. Pela tua vontade boa e agradável sigo firme perseguindo os meus sonhos e objetivos sem nunca cessar. Agradeço por me conceder sabedoria, discernimento e direcionamento durante esta jornada.

Ao meu marido, Douglas Ferreira, meu companheiro, melhor amigo e confidente. Seria impossível descrever nestas poucas frases todo o meu sentimento por ti, por isso por agora, agrago pelos incentivos na minha trajetória, antes, durante e após o mestrado, pelo seu companheirismo, amor, carinho, alegria e esperança que me contagiam e motivam para seguir em busca dos meus sonhos. Nosso amor é bálsamo e luz na minha vida. Agradeço à Deus por tê-lo ao meu lado. Para sempre, amo você.

Aos meus pais, Antônio e Severina, minha base. Minha história começa com vocês, minha formação é oriunda e pautada nos seus princípios, os quais tornaram-me quem sou hoje, por isso lhes agradecerei para sempre. Sou grata por cada conselho, incentivo, ensinamento, investimento, todo amor e pelas ações diárias que são contínuas em minha vida. É difícil resumir em poucas palavras a minha gratidão, mas saibam, vocês são tudo. Amo-os.

A minha família do coração, especialmente meu sogro Berialto Ferreira, cunhados Daivyd Ferreira e Luana Ferreira, muito de quem sou deriva de vocês. Obrigada por toda torcida, motivação e alegria dedicadas a mim.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. César Andrade e Profa. Dra. Maria Danielly. Agradeço pelas lições, treinamento, motivação e amizade ao longo desta etapa. Vocês foram bênção na minha vida, devo-os tudo que aprendi no mestrado. Obrigada por todas as oportunidades e confiança devotadas a mim. Grata!

Ao Prof. Dr. Ludovico Migliolo e a Dra. Patrícia Souza da Universidade Católica Dom Bosco – MS pela parceria e fornecimento do peptídeo Hp-MAP1.

Ao Prof. Dr. Vojtěch Adam (in memoriam) da Universidade Mendel em Brno, República Tcheca do Departamento de Química e Bioquímica, pela parceria na realização das leituras via microscopia eletrônica de varredura.

Aos colegas do grupo de pesquisa em Biodispositivos Nanoestruturados (BioNano), com destaque para Maurília Palmeira, Karen Avelino e todos os outros que contribuíram de alguma forma. Gostaria de expressar minha especial gratidão a Alberto Galdino e Raiza Lucena, cujas valiosas contribuições enriqueceram significativamente esta pesquisa. Agradeço também pelo apoio, disponibilidade e pelo papel fundamental na construção do meu conhecimento.

Às minhas queridas amigas, Kamila Vilar e Thamires Heloise, que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim e celebrando cada conquista. Agradeço pela amizade que começou lá na graduação e que se fortaleceu com o tempo, pela paciência e pelo apoio incondicional. E um agradecimento especial às minhas alunas de iniciação científica, Raíssa Da Cruz e Débora Vitória, que iluminaram os meus dias

mais difíceis durante este processo. Hoje, além de colegas de pesquisa, considero-as grandes amigas. Obrigada pelos sorrisos, pelas palavras de motivação e pelo carinho em cada momento, especialmente durante essa reta final. Vocês foram verdadeiros pilares para mim, como costumo dizer, e fizeram toda a diferença nessa jornada.

A minha sogra Joselita Ferreira (in memoriam), por ter me dado o meu maior presente e companheiro de vida. Finalizo este trabalho em sua homenagem, para que outras pessoas possam usufruir deste conhecimento e salvar vidas. Fazia-me um bem enorme, motivo de grande alegria, hoje é uma grande saudade e motivação.

A FACEPE pelo apoio financeiro concedido a mim e esta pesquisa.

A todos os professores, funcionários e alunos do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) e do Departamento de Bioquímica.

Sou grata a todos os citados anteriormente pela contribuição em minha vida pessoal e acadêmica.

Esse é só o começo. Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam um problema de saúde global. O crescente número de óbitos devido à resistência antimicrobiana aumenta exponencialmente a cada ano, sendo uma das principais razões para o desenvolvimento e aplicação de biossensores como alternativa diagnóstica. Os biossensores apresentam uma ampla gama de vantagens para o diagnóstico clínico, como alta especificidade e sensibilidade. O Hp-MAP1, um peptídeo antimicrobiano sintético derivado da Temporina PTa extraída da pele da rã de barriga de fogo *Hylaranna picturata* da Malásia, tem a capacidade de detectar e diferenciar entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Nesta dissertação descrevemos o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico impedimétrico baseado no peptídeo *Hylaranna picturata* de multiatividade antimicrobiana (Hp-MAP1) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), com o objetivo de detectar bactérias de interesse clínico associadas as IRAS. A superfície do eletrodo de ouro foi modificada através da automontagem de monocamadas de MWCNTs, associadas ao Hp-MAP1. As técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) foram utilizadas para avaliar o desempenho eletroquímico da plataforma sensora, com ferri-ferrocianeto sendo usado como par redox. Os microrganismos utilizados nos ensaios foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A técnica de microscopia de força atômica demonstrou a eficaz imobilização da plataforma sensora nanoestruturada na superfície do eletrodo de ouro. As variações nas respostas impedimétricas, como o aumento da resistência à transferência de carga que resulta visualmente no aumento do diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist, são atribuídas ao complexo peptídeo-bactéria, onde a interação eletrostática inicial se deve principalmente às características da parede celular microbiana. A plataforma sensora desenvolvida demonstrou capacidade para detectar e diferenciar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com destaque nas respostas para o grupo das Gram-negativas. Limites de detecção excelentes foram observados para *P. aeruginosa* (0,60), *K. pneumoniae* (0,42), *E. coli* (0,67) e *S. aureus* (0,59), destacando a eficácia do biossensor MWCNTs_Hp-MAP1 na identificação microbiana. Portanto, pode ser considerada uma alternativa inovadora para auxiliar no diagnóstico bacteriano.

Palavras-chave: biossensor; peptídeo antimicrobiano; eletroquímica; bactérias; nanotecnologia; nanomateriais.

ABSTRACT

Healthcare-Associated Infections (HAIs) represent a global health problem. The increasing number of deaths due to antimicrobial resistance grows exponentially each year, being one of the main reasons for the development and application of biosensors as a diagnostic alternative. Biosensors offer a wide range of advantages for clinical diagnosis, such as high specificity and sensitivity. Hp-MAP1, a synthetic antimicrobial peptide derived from Temporin PTa extracted from the skin of the fire-bellied frog *Hylarana picturata* from Malaysia, has the ability to detect and differentiate between Gram-negative and Gram-positive bacteria. In this dissertation, we describe the development of an impedimetric electrochemical biosensor based on the multi-activity antimicrobial peptide *Hylarana picturata* (Hp-MAP1) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), aimed at detecting clinically relevant bacteria associated with HAIs. The surface of the gold electrode was modified through the self-assembly of MWCNTs, associated with Hp-MAP1. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) techniques were used to evaluate the electrochemical performance of the sensor platform, with ferro/ferricyanide being used as the redox pair. The microorganisms used in the assays were *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. Atomic force microscopy (AFM) demonstrated the effective immobilization of the nanostructured sensor platform on the gold electrode surface. Variations in impedance responses, such as increased charge transfer resistance, resulting visually in the increased diameter of the Nyquist plot semicircle, are attributed to the peptide-bacteria complex, where the initial electrostatic interaction is mainly due to the characteristics of the microbial cell wall. The developed sensor platform demonstrated the ability to detect and differentiate Gram-negative and Gram-positive bacteria, with notable responses for the Gram-negative group. Excellent detection limits were observed for *P. aeruginosa* (0.60), *K. pneumoniae* (0.42), *E. coli* (0.67), and *S. aureus* (0.59), highlighting the efficacy of the MWCNTs_Hp-MAP1 biosensor in microbial identification. Therefore, it can be considered an innovative alternative to assist in bacterial diagnosis.

Keywords: biosensor; antimicrobial peptide; electrochemistry; bacterial; nanotechnology; nanomaterial;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquematização da parede celular bacteriana Gram-positiva e Gram-negativa	29
Figura 2: Representação geral de um biossensor	32
Figura 3: Vantagens dos biossensores	33
Figura 4: Representação dos componentes para condução de experimentos com biossensores.....	36
Figura 5: Disposição de eletrodos utilizados nos estudos eletroquímicos, sistema com dois eletrodos (a), três eletrodos (b) e quatro eletrodos (c).	37
Figura 6 a-b: Aplicação do potencial em uma voltametria cíclica (a); voltamograma cíclico obtido em um sistema reversível (b).....	39
Figura 7: Representação do vetor (fasor) da impedância Z demonstrando as relações entre o complexo de impedância ($ Z $), ângulo de fase (ϕ) e magnitude, Z_{re} e Z_{im} (eixo real e imaginário, respectivamente).	43
Figura 8: Esquematização geral sobre o princípio de funcionamento de um biossensor impedimétrico, antes e após a ligação com o analito.	44
Figura 9 a-b: Diagrama de Nyquist, (Z'') parte imaginária e (Z') parte real da impedância (a), Circuito equivalente de Randles (b).	46
Figura 10 a-b: Interface onde o eletrodo é carregado negativamente (a); Elementos do circuito elétrico referentes à cada componente da interface (b); Variação do potencial elétrico na interface do eletrodo (c) (ET: eletrodo de trabalho; Cdl: capacitância de dupla camada elétrica; R_p : resistência de polarização; Z_w : impedância de Warburg; R_s : resistência da solução; CE: contra eletrodo).....	47
Figura 11: Componentes de um microscópio de força atômica	48

Figura 12: Componentes de um microscópio eletrônico de varredura	50
Figura 13: Componentes de um equipamento de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	51
Figura 14: Demonstração da folha de grafeno (a), CNT de parede simples (B), CNT de múltiplas paredes (c).	53
Figura 15: Estrutura 3D dos principais PAMs descritos atualmente na literatura	55
Figura 16 a-c: Esquematização dos diferentes modos de ação descritos, carpete (a), barril (b), e poro toroidal (c).	56
Figura 17: Representação esquemática da plataforma sensora MWCNTs_Hp-MAP1.	62
Figura 18: Esquematização da plataforma sensora MWCNTs_Hp-MAP1.	65
Figura 19 a-b: Avaliação da solução de eletrodeposição via MEV	66
Figura 20 a-d: Imagens 3D (5.0 μm x 5.0 μm) via AFM da topografia do processo de modificação da superfície do ET via eletrodeposição de MWCNTs (a), MWCNTs_Hp-MAP1 (b), interações com bactérias Gram-positiva (c) e Gram-negativa (d).	67
Figura 21: Espectro FTIR-ATR da solução de MWCNTs.	68
Figura 22: Voltamograma cíclico obtido durante processo de eletrodeposição do MWCNTs em 0,1 M L – H ₂ SO ₄	69
Figura 23: Diagrama de Nyquist do processo de montagem do biossensor.	69
Figura 24 a-d: Diagramas de Nyquist do biossensor impedimétrico MWCNTs_Hp-MAP1 para a P. aeruginosa (a), K. pneumoniae (b), E. coli (c) e S. aureus (d).	70
Figura 25: Circuito equivalente de Randles.	71

Figura 26: Gráfico de barras com valores do ΔRCT obtidos a partir dos experimentos com microrganismos dos grupos Gram-negativos e positivos, nas concentrações de 10^1 a 10^6 UFC/mL. *P. aeruginosa* (vermelho), *K. pneumoniae* (azul), *E. coli* (verde), *S. aureus* (ciano). 74

Figura 27: Grau de recobrimento do sensor (θ) após o reconhecimento bacteriano (10^1 - 10^6 UFC/mL). 76

Figura 28: Gráfico tridimensional referente aos valores de RCT, Q e N, obtidos como resultado do ajuste dos valores do circuito de Randles. Vermelho (*P. aeruginosa*), rosa (*K. pneumoniae*), verde (*E. coli*) e azul (*S. aureus*). 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais biorreceptores utilizados na montagem de biossensores. 34

Tabela 2: Parâmetros obtidos da montagem da plataforma sensora após ajuste das respostas impedimétricas com o circuito equivalente de Randles. 71

Tabela 3: Parâmetros obtidos das interações com os microrganismos alvo. 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
AC	Corrente alternada (do inglês, <i>Alternating current</i>)
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês, <i>atomic force microscopy</i>)
Ag	Prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APTs	Aptâmeros
ATCC	Coleção de Cultura do Tipo Americano (do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>)
ATR	Reflexão total atenuada (do inglês, <i>Attenuated total reflection</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CE	Contra eletrodo
Cl	Cloreto
CNT	Nanotubos de carbono (do inglês, <i>Carbon Nanotubes</i>)
CSE	Cobre/sulfato de cobre
CTAB	Ácido Cetiltrimetilamônio (do inglês, <i>Cetyltrimethylammonium acid</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Ensaio de Imuno Absorção Enzimática (do inglês, <i>Enzyme Immunosorbent Assay</i>)
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
EUA	Estados Unidos da América
Fmoc	Método de fase sólida
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GBD	Carga global de morbidade (do inglês, <i>Global burden of morbidity</i>)
Hg	Mercúrio
HgO	Óxido de Mercúrio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HSV	Vírus Herpes Simples (do inglês, <i>Herpes Simplex Virus</i>)
IHs	Infecções hospitalares
IR	Radiação Infravermelha (do inglês, <i>Infrared Radiation</i>)
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IRE	Elemento de reflexão interna
LOD	Limite de Detecção (do inglês, <i>Limit of Detection</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo (do inglês, <i>Lipopolysaccharide</i>)
MAM	Monocamada Automontada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês, <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
MS	Ministério da saúde
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, <i>Multi-walled Carbon Nanotubes</i>)
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NMs	Nanomateriais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAM	Peptídeo antimicrobiano
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PEH	Plano externo de Helmholtz
PG	Peptideoglicano
PIH	Plano interno de Helmholtz
POC	Point of Care
QDs	Pontos Quânticos
Ra	Rugosidade média aritmética
RAM	Resistência Antimicrobiana
Rms	Rugosidade média quadrática
RNA	Ácido Ribonucleico
RP-HPLC	Fase reversa de alta performance por cromatografia líquida
SNR	Baixa relação sinal-ruído
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede simples (do inglês, <i>Single-walled Carbon Nanotubes</i>)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNDP	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (do inglês, <i>United Nations Development Program</i>)
VC	Voltametria Cíclica

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Percentual
Rct	Resistência à transferência de carga
Cdl	Capacitância de Dupla Camada Elétrica
Rp	Resistência de Polarização
Zw	Impedância de Warburg
Rs	Resistência da Solução
Ω	Ohm
I	Corrente
E	Potencial
Z	Impedância
ZF	Impedância Faradaica
ϕ	Ângulo de Fase
Zre / Z'	Eixo Real da Impedância
Zim / Z''	Eixo Imaginário da Impedância
Z	Módulo da Impedância
ω	Frequência angular
ΔR_{ct}	Variação Relativa do Rct
θ	Grau de Recobrimento de Superfície
V	Volts
O	Oxigênio
H	Hidrogênio
C	Carbono
N	Nitrogênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
D	Dimensão
M	Molar
KCL	Cloreto de Potássio
cm	Centímetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
3.1 CONTEXTO DAS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE	25
3.1.2 Fatores predisponentes às IRAS	27
3.1.3 Microrganismos prevalentes nas IRAS	28
3.1.3.1 Vírus, protozoários e fungos	28
3.1.3.2 Bactérias gram-negativas e gram-positivas	29
3.2 BIOSSENSORES	32
3.2.1 Classificação por tipo de biorreceptor	33
3.2.1.1 Classificação baseada no tipo de transdutor	35
3.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	35
3.3.1 Classificação dos métodos eletroanalíticos	37
3.4 ELETROQUÍMICA	38
3.4.1 Voltametrias	38
3.4.2 Espectroscopia de impedância	40
3.4.2.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica	41
3.4.2.2 Circuito equivalente	44
3.4.2.3 Dupla camada elétrica	46
3.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSENSORES	48
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	49
3.7 ESPETROSCOPIA INFRAVERMELHA COM TRANSFORMADA DE FOURIER	50
3.8 NANOMATERIAIS	52
3.8.1 Classificação quanto a dimensionalidade	52
3.8.2 Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	52
3.8.3 Aplicações em biossensores	53
3.9 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	54
3.9.1 Tipos e características estruturais	54
3.9.2 Modo de interação com membranas biológicas	56
3.9.2.1 Hidrofobicidade	56
3.9.2.2 Carga	57

3.9.2.3 Anfipaticidade	57
3.9.2.4 Ângulo polar	57
3.9.2.5 Áreas de aplicação	58
3.9.3 Temporinas	58
3.9.3.1 Temporina-PTa: propriedades e estrutura	59
3.9.4 Peptídeo <i>Hylarana picturata</i> Multiatividade 1 (Hp-MAP1)	59
4 METODOLOGIA	61
4.1 MATERIAIS	61
4.2 SÍNTESE DO PAM HP-MAP1	61
4.3 MODIFICAÇÃO DA PLATAFORMA BIOCENSORA COM MWCNTS E PAM HP-MAP1	61
4.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	63
4.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	63
4.6 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	63
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 PLATAFORMA SENSORA MWCNTS_HP-MAP1	65
5.2 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DAS ETAPAS DE MONTAGEM DO ELETRODO	65
5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	65
5.2.2 Microscopia de Força Atômica	66
5.3 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA COM TRANSFORMADA DE FOURIER	67
5.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA SENSORA MWCNTS_HP-MAP1	68
5.4.1 Performance bioanalítica da plataforma sensora	70
6 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE A – NANOSENSOR BASED ON HP-MAP1 AND CARBON NANOTUBES FOR BACTERIA DETECTION	91

1 INTRODUÇÃO

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) configuram-se como um problema de saúde pública global em ascensão. Descrevem-se como toda infecção adquirida pelo paciente durante ou após o atendimento hospitalar, abrangendo ambientes como hospitais, clínicas e domicílios. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as IRAS causam cerca de 40.000 mortes por ano, chegando a 25% nos países em desenvolvimento e de 5-15% nos países desenvolvidos (Lemiech, et al., 2021).

Segundo dados da carga global de morbidade (GBD), cerca de 5 milhões de pessoas foram a óbito devido a doenças relacionadas a resistência antimicrobiana (RAM). As populações mais afetadas são idosas e crianças, em 2019, 1 em cada 5 mortes de crianças com menos de 5 anos foi causada por RAM. Alguns patógenos têm maior incidência nas mortes relacionadas às RAMs, como os pertencentes ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). Este grupo de microrganismos foi considerado como agentes patogênicos prioritários pela OMS (Murray, et al., 2022).

Meios tradicionais de diagnóstico microbiológico são amplamente aplicados na prática clínica, todavia, apresentam diversas limitações. A técnica de coloração bacteriana é tida como padrão ouro para diagnóstico dada sua simplicidade e eficácia. A principal deficiência nesta técnica é o tempo requerido para cultivo, isolamento e crescimento das cepas bacterianas, sendo necessário normalmente de 24-48 horas. Técnicas moleculares como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e Ensaio de Imuno absorção enzimática também são utilizadas em virtude de sua acurácia e reprodutibilidade com limite de detecção (LOD) na ordem de $10^1 - 10^4$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) (Castle, et al., 2021).

Apesar de suas vantagens PCR e ELISA são técnicas que necessitam de instalações laboratoriais, equipamentos específicos e pessoal treinado para sua execução, tornando difícil implementá-las para uso em campo e diagnóstico rápido. O desenvolvimento de métodos de identificação bacteriana que possibilitem a

diminuição no tempo de resposta, aumento da sensibilidade e especificidade e que minimize os custos com saúde pública e tratamentos medicamentoso faz-se necessário e possível com a criação de biossensores (Fatima, et al., 2022).

Os biossensores são biodispositivos de diagnóstico que surgem como uma alternativa inovadora e eficaz para identificação bacteriana rápida que não necessita de pessoal treinado para seu uso, viabilizando também os testes do tipo point-of-care (Castle, et al., 2021; Fatima, et al., 2022). O biossensor é um sensor biológico que consiste em um elemento de bioreconhecimento (peptídeos, anticorpos, fragmentos de DNA, RNA, células, enzimas, etc) e um transdutor físico-químico responsável por converter o sinal eletroquímico em um dado mensurável (Chadha, et al., 2022).

Diferentes tipos de técnicas podem ser empregados para analisar as respostas geradas pelos biossensores, as técnicas de detecção elétricas e eletroquímicas são amplamente difundidas devido ao tempo de resposta curto e simplicidade de detecção. A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) é um tipo de técnica eletroquímica altamente sensível e utilizada nos estudos de interface-superfície. A EIE utiliza propriedades elétricas (potencial, carga e corrente), que quando alteradas geram um aumento ou diminuição no diâmetro do semicírculo de Cole-Cole no diagrama de Nyquist (Da silva-junio, et al., 2022a).

Os nanomateriais vêm sendo aplicados no desenvolvimento de biossensores devido às suas vantagens como versatilidade, aumento da estabilidade química, biocompatibilidade, etc. Destes, os Nanotubos de Carbono (CNTs) podem ser divididos em de paredes simples (SWCNTs) ou Paredes Múltiplas (MWCNTs). Os MWCNTs destacam-se por apresentarem características como, atividade eletrocatalítica, rápida cinética de transferência de elétrons, aumento da área superficial de contato e aumento da condutividade do sistema (Bekmezci, et al., 2020; Yoon, et al., 2020).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são proteínas de baixo peso molecular com atividade antimicrobiana, tornando-os destacadas alternativas frente ao grande problema da resistência antimicrobiana aos antibióticos. Amplamente disponíveis na natureza, podendo ser encontrados em animais, plantas e microrganismos tornaram-

se alvos de pesquisas. Podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas, os PAMs conseguem interagir de diversas formas com o analito, sendo uma delas a interação eletrostática (Souza e Silva, et al., 2022).

O peptídeo *Hylarana picturata* Multiatividade 1 (Hp-MAP1) (AAGKVLKLLKLL-COOH) é um PAM sintético derivado da Temporina-PTa (FFGSVLKLIPKIL-COOH) retirada de secreções da pele do sapo da espécie *Hylarana picturata* conhecido popularmente como sapo de riacho manchado da Malásia. Classifica-se como um PAM anfipático, catiônico α -hélice e carga positiva de +4, e consegue interagir eletrostaticamente com a parede celular bacteriana e romper a membrana citoplasmática gerando apoptose (Souza e Silva, et al., 2022).

Neste trabalho, o PAM Hp-MAP1 foi utilizado como elemento de bioreconhecimento na plataforma sensora MWCNTs_Hp-MAP1 para identificação de bactérias patogênicas Gram negativas e Gram positivas causadoras de IRAS, baseado na capacidade de identificação da parede celular do microrganismo pelo Hp-MAP1 (Zare; Sheraki, 2019; Souza e Silva, et al., 2022).. Assim, a presente dissertação, objetivou principalmente o desenvolvimento de um biossensor nanoestruturado impedimétrico como alternativa inovadora para aplicação no auxílio ao diagnóstico microbiológico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma plataforma biossensora nanoestruturada baseada em camada eletrodepositada de MWCNTs e peptídeo antimicrobiano Hp-MAP1 para o bioreconhecimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas de interesse clínico através da técnica de EIE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e avaliar a eletrodeposição dos MWCNTs e a imobilização do PAM Hp-MAP1 sobre a superfície do eletrodo de ouro;
- Avaliar a morfologia da solução de eletrodeposição por Microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar as características eletroquímicas da interação das bactérias com o sistema sensor;
- Definir e avaliar o circuito equivalente para obtenção de parâmetros eletroquímicos;
- Determinar e avaliar o limite de detecção (LOD) e faixa linear obtido pelo biossensor;
- Determinar a capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) através de cálculos teóricos a partir de resultados experimentais e da resistência à transferência de carga (R_{CT});
- Analisar a morfologia e estrutura do sistema sensor antes e após o contato com os patógenos alvo utilizando a técnica de AFM;
- Avaliar a composição química e a presença de grupos funcionais presentes na solução de eletrodeposição de MWCNTs utilizando a técnica de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CONTEXTO DAS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), também conhecidas como Infecções Hospitalares (IHs), são definidas pelo Ministério da Saúde (MS) como infecções que abrangem os ambientes hospitalar, domiciliar e ambulatorial (FIOCRUZ, 2010). As infecções podem ocorrer durante a internação ou manifestar-se de 48 horas até 30 dias após o atendimento (Suetens, et al., 2018). Normalmente, as IRAS estão associadas à hospitalização em unidades de terapia intensiva (UTIs) (Gil, et al., 2018; Monegro; Muppidi; Regunath, 2023).

O registro das infecções causadas por microrganismos em ambientes hospitalares data de séculos atrás, iniciando com a criação de grandes centros hospitalares em meados dos séculos XIX. Está principalmente ligado à incidência de epidemias e pandemias que ocorriam frequentemente em locais com populações pobres. As condições precárias de saneamento básico e higiene da época configuram-se como o principal fator para o desencadeamento de surtos, como a pandemia de Cólera no século XIX, com relatos de casos até os dias atuais (Ferraz, 2020).

O cenário das práticas de saúde começou a sofrer mudanças na segunda metade do século XIX, com as contribuições de Louis Pasteur e Robert Koch. Seus estudos trouxeram conhecimentos primordiais nas áreas da microbiologia e medicina, apontando a higienização das mãos como fator importante para diminuição da contaminação cruzada. O conceito de imunidade também foi introduzido, e métodos como a pasteurização tornaram-se populares, diminuindo as infecções por microrganismos através da ingestão de alimentos (Cavaillon; Legout, 2022; Ferraz, 2020).

As IRAS surgiram aproximadamente durante as primeiras décadas de cuidados em UTIs (1950-1970). Nos primeiros relatos, as IRAS predominavam em sítios cirúrgicos, sendo as principais infecções do trato urinário e bacteremia, com os principais agentes patogênicos sendo *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*,

Klebsiella sp e *Staphylococcus aureus*. Embora estas infecções fossem suscetíveis aos tratamentos com antibióticos, posteriormente, nas décadas de 1980-1990, houve um crescimento considerável na associação das IRAS com a resistência antimicrobiana (RAM) (Kollef, et al., 2021).

Apesar do avanço da medicina e tecnologia ao longo dos anos, as IRAS ainda prevalecem e configuram-se como um grande problema de saúde pública global. De acordo com dados da OMS, as IRAS são responsáveis por cerca de 40,000 mortes por ano, o que representa um nível de infecções nosocomiais de 25% nos países em desenvolvimento e de 5-15% nos países desenvolvidos. Mundialmente, cerca de 234 milhões de pacientes passam por procedimentos cirúrgicos invasivos, nos quais aproximadamente 1 milhão vão a óbito e 7 milhões apresentam complicações no pós-operatório devido a essas infecções (Ardisson; Miranda; Teixeira 2018; Ewelina, et al., 2021).

A maior incidência de IRAS ocorre em países em desenvolvimento, o que reflete principalmente nos aspectos econômicos. Segundo o relatório do desenvolvimento humano publicado em 2019 pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (UNDP), a América Latina ainda apresenta elevados níveis de falta de saneamento básico e infraestrutura hospitalar em regiões pobres. Além disso, o uso de equipamentos desatualizados e a falta de políticas públicas para o controle de infecções são comuns, especialmente devido à coexistência de problemas de saúde adversos que afetam a população. Todos esses fatores contribuem para o aumento do risco de IRAS (Conceição, 2019).

As IRAS geram inúmeras complicações para os pacientes e também para o setor de saúde, pois, aumentam o tempo de permanência na unidade hospitalar, provocam altas taxas de morbidade e mortalidade, diminuem a qualidade de vida e acarretam custos adicionais para o sistema de saúde. Além disso, geram custos extras relacionados ao tempo prolongado de hospitalização ou à readmissão de pacientes (Maria; Gomes, 2021; Nguemeleu, et al., 2020).

3.1.2 Fatores predisponentes às IRAS

Pacientes hospitalizados têm normalmente uma maior susceptibilidade para desenvolver infecções adversas. As IRAS ocorrem por duas vias: exógena, onde a infecção é provocada por fatores externos, como contato com profissionais de saúde e/ou artigos hospitalares (Gurgel, et al., 2022). A via endógena engloba realização de procedimentos cirúrgicos invasivos e/ou imunossupressão. Além disso, outros fatores contribuem para a instalação da infecção, tais como idade (neonatos ou idosos), estado nutricional, uso de drogas e tabagismo (Gil, et al., 2018).

As infecções hospitalares costumam afetar áreas específicas do paciente. As taxas mais elevadas, são geralmente observadas em infecções de sítio cirúrgico, responsáveis por 14 a 16% de todas as IHS assim como em infecções no pulmão, no sistema urinário e sanguíneo. As infecções pulmonares estão relacionadas ao uso de ventiladores mecânicos e traqueostomias, enquanto as infecções do sistema urinário podem surgir devido a cateteres, além de serem influenciadas por doenças de base como diabetes mellitus, imunocomprometimento, e estado nutricional precário (Verli; Gonçalves, 1967).

O uso indiscriminado de antimicrobianos também representa um fator de risco para a instalação da infecção. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a OMS classificam os patógenos resistentes aos antimicrobianos como uma ameaça iminente à saúde humana, tornando a resistência antimicrobiana (RAM) atualmente um problema crônico de saúde pública em nível global. Embora a RAM ocorra de forma natural no meio ambiente, o uso de antibióticos gerou pressão seletiva para a presença de genes de resistência nos microrganismos (De oliveira, et al., 2020).

Em 2019, com a pandemia gerada pelo COVID-19, os índices de RAM aumentaram ainda mais, com previsão de causar aproximadamente 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo até 2050. Segundo dados do CDC, no primeiro trimestre de 2021, foram registrados recordes de hospitalização nos Estados Unidos da América (EUA), com um aumento no número de casos de bacteremia, infecções

no trato urinário e em cateteres, infecções associadas à ventilação mecânica e infecções de sítio cirúrgico (Weiner-lastinger, et al., 2022).

3.1.3 Microrganismos prevalentes nas IRAS

Em um estudo conduzido por Mesquita et al., (2023), foram observados os agentes patogênicos responsáveis pelas infecções hospitalares em pacientes. Alguns microrganismos destacaram-se em relação a outros. *Pseudomonas aeruginosa* foi o mais prevalente nos principais sítios de infecção, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, que foi encontrada principalmente em infecções pulmonares e, em menor quantidade, na corrente sanguínea (causando bacteremia). Além disso, observou-se a presença de *Staphylococcus aureus* em infecções de sítio cirúrgico e pulmonares, enquanto *Escherichia coli* estava presente em todos os sítios de infecção, com ênfase no trato urinário (Mesquita, et al., 2023).

Existe uma grande variedade de patógenos capazes de gerar IRAS. Fatores como região geográfica, tipo populacional, sistema de saúde e instalações de saúde variam em cada país. De acordo com um levantamento realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2004), os principais microrganismos envolvidos são bactérias, fungos e vírus. Em um estudo, constatou-se que os microrganismos mais isolados foram Enterobacterales (34,4%), incluindo espécies como *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter*, seguidos por *S. aureus* (30,1%), *P. aeruginosa* (28,7%), Estafilococos coagulase-negativos (19,1%), e fungos (17,1%) (Cordeiro Baptista, et al., 2020; Reynolds; Kollef, 2021).

3.1.3.1 Vírus, protozoários e fungos

Apresentam-se em menor proporção em relação às bactérias, todavia, infecções virais como a COVID-19, influenza, citomegalovírus, HIV, HSV, rotavírus e as hepatites B e C têm potencial para comprometer o sistema imunológico do paciente e torná-lo suscetível à instalação das IRAS (Sikora; Zahra, 2020; Furnkranz; Walochnik, 2021). Os principais meios de infecção viral ocorrem por transfusões sanguíneas, procedimentos de diálise, injeções e endoscopia (Zilberbeg; Khan; Shorr, 2023).

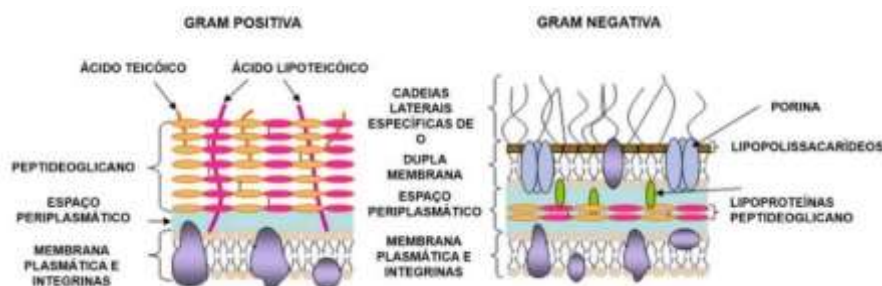
Protozoários como a *Giardia lamblia* e *Entamoeba sp.* são facilmente transmitidos, especialmente entre crianças, podendo desencadear infecções. Os fungos são organismos oportunistas que geralmente causam infecções quando o sistema imunológico do paciente está comprometido. Entre os pacientes imunocomprometidos, os casos mais prevalentes envolvem *Candida albicans*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptosporidium* (Furnkranz; Walochnik, 2021; Suleyman, Alagaden, 2021).

3.1.3.2 Bactérias gram-negativas e gram-positivas

Apesar de diversos agentes patogênicos apresentarem potencial para causar IRAS, as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas se destacam (Hassan; Aftab; Riffat, 2015). Essas bactérias podem ser classificadas em comensais e patogênicas. As comensais, como a *E. coli*, estão presentes na microbiota de indivíduos saudáveis, oferecendo proteção contra bactérias patogênicas, porém, podem causar infecções em condições como imunossupressão e uso excessivo de antibióticos. Por outro lado, as bactérias patogênicas são altamente virulentas e resistentes, podendo causar infecções isoladas ou epidêmicas, independentemente do estado do hospedeiro (Fitzgerald, et al., 2020).

A presença de enzimas de resistência e elementos de virulência, como plasmídeos recombinantes, são características que tornam as bactérias patogênicas perigosas, com alta incidência nas IRAS, e podem ser divididas com base na composição de sua parede celular (Fitzgerald, et al., 2020). As principais distinções entre as paredes celulares das bactérias podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1: Esquematização da parede celular bacteriana Gram-positiva e Gram-negativa



Fonte: adaptada de Atanasova, 2010.

A composição básica da parede celular bacteriana normalmente consiste em, sua maioria, peptidoglicano (PG) e uma camada formada por filamentos de polissacarídeos, compostos por uma estrutura principal de –[N – acetilglucosamina (GlcNAc)- ácido N acetilmurâmico (MurNAc)], reticulados por meio de pontes peptídicas curtas ligadas aos resíduos MurNAc. Além de tudo, a camada de PG pode ser complementada com polímeros de parede celular secundária, como ácidos teicóicos (polímeros de poli-ol-fosfato), ou polissacarídeos de cápsula que estão covalentemente ligados ao PG (Dorr; Moynihan; Mayer, 2019; Huan, et al., 2020).

As bactérias Gram-negativas da ordem *Enterobacterales*, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros, frequentemente causam IRAS devido à sua capacidade de colonização nos sítios onde os pacientes estão mais imunocomprometidos, como áreas de inserção de sondas, cateteres e cânulas, resultando em diversas infecções, como infecções de sítio cirúrgico, pulmonares, peritoniais e bacteremia (Li; Plésiat; Nikaido, 2015; Mehrad, et al., 2015). O grupo das bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus pyogenes* e outros, causam um vasto número de infecções, incluindo infecções pulmonares, ósseas, das valvas cardíacas e corrente sanguínea (Iskandar, et al., 2021).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria com formato de bastão, Gram-negativa e aeróbia não fermentativa. Possui como mecanismo de defesa e resistência a produção de um biofilme polissacarídeo que a protege da defesa do hospedeiro, sendo considerada um microrganismo encapsulado (Thi; Wibowo; Rehm, 2020). Manifesta-se normalmente em infecções do trato urinário, sítio cirúrgico, pneumonia e bacteremia. Estima-se que sua prevalência atinja cerca de 7,1% a 7,3% entre todas as IRAS. Um mecanismo comum de virulência é a presença de flagelos e pili em sua superfície, conferindo motilidade e fixação ao epitélio respiratório (Reynolds; Kollef, 2021).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria bacilar Gram-negativa encapsulada, sem motilidade, anaeróbia facultativa e oxidase negativa, pertencente à ordem *Enterobacterales*. Normalmente, é encontrada em infecções do trato gastrointestinal,

pele e região orofaríngea. Seus mecanismos de virulência incluem a presença de cápsula polissacarídicas, lipopolissacarídeo (LPS) revestindo a parede celular, fímbrias que proporcionam adesão e a presença de sideróforos que sequestram o ferro do organismo (Farzand, et al., 2021).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, oxidase negativa e anaeróbia facultativa. Dentre as infecções mais comuns causadas por *E. coli*, destacam-se pneumonia, infecções do trato urinário e feridas, meningite em neonatos e gastroenterite, especialmente em pacientes hospitalizados imunocomprometidos. Alguns elementos comuns de virulência são observados na ordem *Enterobacterales*, como a presença de endotoxinas, cápsula e RAM (Pakbin; Bruck; Rossen, 2021).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva com formato esférico, reconhecida por ser a mais perigosa entre todas as bactérias estafilocócicas comuns. É um dos principais patógenos causadores de pneumonia e outras infecções do trato respiratório, sítio cirúrgico, infecções cardiovasculares, bacteremia e infecções de próteses articulares. Devido à resistência aos antimicrobianos, os *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são os mais clinicamente relevantes (Cheung; Bae; Otto, 2021).

Os métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico englobam várias técnicas, como a técnica de coloração de Gram, considerada o padrão ouro para diagnóstico (Castle, et al., 2021). Outras técnicas empregadas em laboratórios de maior porte incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA). Embora ofereçam boa especificidade em matrizes de amostras complexas, esses métodos requerem instalações laboratoriais adequadas, operadores capacitados e preparações complexas, além de um tempo prolongado para entrega dos resultados, tornando-os inadequados para aplicação em campo (Karbelkar; Furst, 2020).

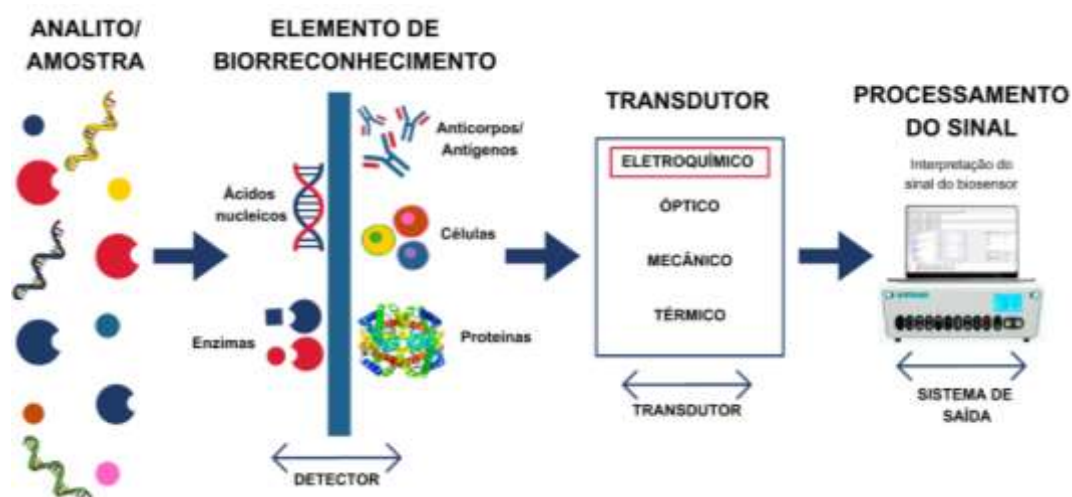
Dessa forma, torna-se necessário buscar e implementar técnicas alternativas inovadoras para o diagnóstico microbiológico, visando a diminuição do tempo de resposta, melhor detecção do analito e tornando-o mais acessível e de fácil uso em

campo. Com o avanço da nanotecnologia e o desenvolvimento tecnológico, é possível atualmente criar biodispositivos analíticos de diagnóstico, como os biossensores eletroquímicos.

3.2 BIOSSENSORES

Os biossensores configuram-se como excelentes ferramentas analíticas alternativas para o diagnóstico, apresentam rapidez e sensibilidade na detecção de analitos de interesse clínico. São instrumentos biotecnológicos criados para facilitar os procedimentos analíticos, como os processos de interação biológica que ocorrem com o analito (Karbelkar; Furst, 2020). Na figura 2, é demonstrado como os biossensores são compostos.

Figura 2: Representação geral de um biossensor



Fonte: Adaptado de Bag; Mandal, 2022.

Os biossensores em comparação com as metodologias analíticas tradicionais, oferecem inúmeros benefícios, incluindo a possibilidade de miniaturização, alta sensibilidade e especificidade, diagnóstico rápido, preparação mínima de amostra, alto rendimento e portabilidade. Essas vantagens, juntamente com o custo-benefício e os testes de diagnóstico no ponto de atendimento (POC - point-of-care), tornam os biossensores cada vez mais importantes para pesquisas na área das análises clínicas (Fatima, et al., 2022). A figura 3 apresenta um esquema sobre as vantagens dos biossensores.

Figura 3: Vantagens dos biossensores

Fonte: Próprio autor, 2023.

3.2.1 Classificação por tipo de biorreceptor

Os biossensores são dispositivos compostos por moléculas biológicas imobilizadas em transdutores, capazes de reconhecer e amplificar sinais de detecção, fornecendo informações analíticas sobre a amostra. Os receptores biológicos utilizados incluem biocatalíticos/enzimáticos (proteínas, tecidos, antígenos, anticorpos, ácidos nucleicos, peptídeos, entre outros) e bioligantes (lectinas, proteínas, DNA/RNA), que interagem especificamente com o analito-alvo, gerando reações bioquímicas mensuráveis (Amaral, et al., 2023; Huang; Zhu; Kianfar, 2021; Roushani, et al., 2020).

Os biossensores biocatalíticos incorporam elementos como enzimas, células ou tecidos para identificar o analito e gerar espécies eletroativas, enquanto os biossensores bioligantes interagem seletivamente com o analito por meio de uma ligação específica. Eles são utilizados para detectar substâncias como glicose, lactose e xantino, além de terem aplicações em áreas como controle de toxinas alimentares, diagnóstico biomédico, identificação de microrganismos, etc (Amaral, et al., 2023; Huang; Zhu; Kianfar, 2021; Roushani, et al., 2020). Na tabela 1, são apresentados alguns exemplos de biorreceptores.

Tabela 1: principais biorreceptores utilizados na montagem de biossensores.

Biorreceptor	Plataforma sensora	Transdutor	Alvo microbiano	LOD (UFC/mL)	Referência
Temporin-PTA (T-PTa)	MBA_Fe3O4 @Au_T-PTa	VC e EIE	<i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i> , e <i>C. tropicalis</i>	10 ¹ UFC/mL	da Silva-Junio, et al., 2022.
cDNA	AUNPs_SiNPs _GA_cDNA	DPV	<i>V. cholerae</i>	1,1513 x 10 ⁻¹³ µg/µL	Futra, et al., 2023
Anticorpo Anti-HEV	Ab-N_S-GQD@AuNP_PAni	VC e EIE	HEV	0,8 fg/mL ⁻¹	Chowdhury, et al., 2019
Enzima Lacase	Lac_(PLLY)CA -GR_GCE	VC, DPV e EIE	17β-Estradiol	1,3 x 10 ⁻¹³ mol/mL	Wang, et al., 2019
Hp-MAP1	MWCNTs_Hp-MAP1	EIE	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	10 ¹ UFC/mL	Esse trabalho

Fonte: Próprio autor, 2024.

No estudo de da Silva-Junior, et al., (2022), o PAM Temporin-PTA foi utilizado na montagem de um biossensor composto por ácido mercapto-benzóico (MBA) e nanocomposto de nanopartículas de óxido de ferro e ouro (Fe3O4@Au) para detecção de microrganismos patogênicos, apresentando limite de detecção de 10¹ UFC/mL. Futra, et al., (2023) construiu um genosensor baseado em cDNA, nanopartículas de ouro (AuNPs) e sílica (SiNPs) e imina com glutaraldeído (GA) para detecção do DNA de *Vibrio cholerae*, com limite de detecção de 1,1513 x 10⁻¹³ µg/µL.

Outro estudo conduzido por Chowdhury, et al., (2019), utilizou um anticorpo específico para o vírus da hepatite E (anti-HEV) conjugado a pontos quânticos de grafeno codificados com nitrogênio e enxofre (Ab-N_S-GQDs) combinados aos nanofios de polianilina incorporados em ouro (AuNP-PAni), apresentando limite de detecção de 0,8 fg/mL⁻¹. Wang, et al., (2019), construíram um biossensor baseado na plataforma composta por enzima Lacase (Lac), filme de L-lisina, modificado por ácido cítrico@grafeno (CA-GR), o qual apresentou LOD de 1,3 x 10⁻¹³ mol/mL.

3.2.1.1 Classificação baseada no tipo de transdutor

O transdutor é o elemento responsável por imobilizar um biorreceptor, e este processo ocorre fisicamente ou quimicamente. Ele converte o sinal obtido de uma reação química em um dado mensurável. A conversão é feita por vários meios, e os biossensores podem ser classificados conforme o sistema de conversão aplicado. Os principais sistemas são: ópticos (baseados em luminescência, absorção e ressonância plasmônica de superfície), sistema baseados em massa (medição de flexão, e mudança de frequência de ressonância) e sistemas eletroquímicos (mensura mudanças de impedância, corrente, potencial, etc) (Huang; Zhu; Kianfar, 2021).

3.3 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Os biossensores eletroquímicos desempenham um papel crucial em um campo científico multidisciplinar, os biossensores eletroquímicos destacam-se como uma das áreas de pesquisa mais dinâmicas na química analítica. Sua adoção frequentemente reduz a necessidade de procedimentos complexos de preparação de amostras, sendo avaliados através de experimentos capazes de mensurar parâmetros como sensibilidade, limite de detecção (LOD), faixas de linearidade e dinâmica, reprodutibilidade, precisão da resposta e seletividade (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

Atualmente, os biossensores eletroquímicos são considerados o grupo mais promissor para detecção de patógenos devido a suas vantagens, como análise em tempo real, portabilidade, reprodutibilidade, baixo custo, rapidez e alto rendimento (Cesewski; Johnson, 2020). Como resultado, o desenvolvimento desses biossensores tem crescido exponencialmente nos últimos anos (Pan, et al., 2024; Zhang; Zhou; Du, 2019).

A eletroquímica é o estudo das reações químicas que ocorrem na interface de um condutor eletrônico (eletrodo) e um condutor iônico (eletrólito). Essas reações englobam processos de oxidação e redução das espécies eletroativas a partir da transferência de elétrons na interface presente entre o eletrólito a superfície do eletrodo de trabalho. Essas reações ocorrem dentro de uma célula eletroquímica,

constituída pelos seguintes itens, como apresentado na figura 4 (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021; Rubino; Queirós, 2023).

Eletrodo: dispositivo com superfície condutora de elétrons, local onde ocorrem todas as reações eletroquímicas e as principais trocas de elétrons;

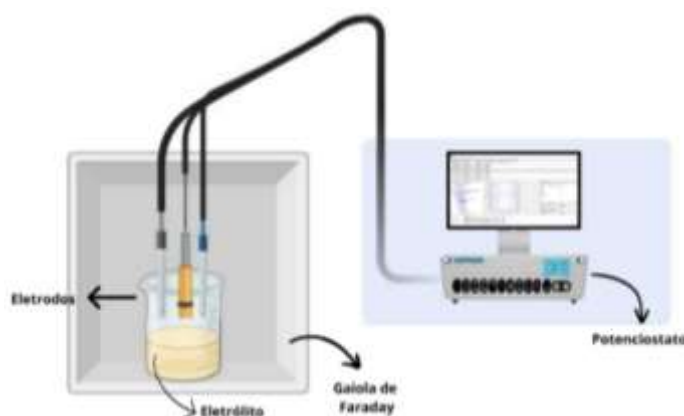
Eletrólito: condutor iônico que permite a livre movimentação entre os eletrodos presentes na reação;

Célula eletroquímica: local onde são dispostos os eletrodos e eletrólitos. Normalmente, feito em vidro temperado e teflon;

Câmara: conhecida como gaiola de Faraday, é um invólucro feito de material condutor e usado para blindar o seu interior de interferências eletromagnéticas externas;

Potenciostato: equipamento que controla a variação do potencial e corrente.

Figura 4: Representação dos componentes para condução de experimentos com biossensores.

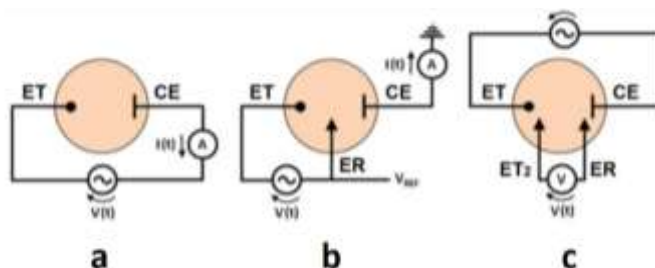


Fonte: Próprio autor, 2023.

Na composição de uma célula eletroquímica, diferentes eletrodos desempenham funções específicas. O eletrodo de trabalho, geralmente feito de materiais inertes como ouro, prata ou carbono vítreo, é onde ocorrem as reações de interesse. O contra eletrodo, composto por material inerte como grafite ou platina, completa o caminho da corrente na célula, possuindo uma área de superfície maior que o eletrodo de trabalho para garantir estabilidade na análise da cinética eletroquímica. O eletrodo de referência fornece um potencial estável e conhecido durante os experimentos, sendo os mais comuns o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), cobre/sulfato de cobre, (CSE), mercúrio/óxido de mercúrio (Hg/HgO) e calomelano saturado (SCE) (Huang; Zhu; Kianfar, 2021).

A quantidade de eletrodos em um sistema eletroquímico varia de acordo com a técnica e finalidade do experimento. Uma célula com dois eletrodos requer apenas CE e ET, sendo adequada para estudos de armazenamento de energia em dispositivos de conversão, como painéis fotovoltaicos, supercapacitores e baterias (HAIDER, et al., 2020). Já uma célula com três eletrodos, comumente utilizada na construção de biossensores, inclui ET, ER e CE, permitindo o controle do potencial na interface do ET por meio do ER (possui potencial constante) (Nölle et al., 2020). Células com quatro eletrodos adicionam dois ER e são empregadas em aplicações que requerem medição de potencial entre fases imiscíveis ou separadas por membrana, permitindo calcular a resistência da interface e a condutividade da membrana (Grossi; Riccò, 2017). Sendo assim, existem diferentes configurações de eletrodos disponíveis, como observado na figura 5:

Figura 5: Disposição de eletrodos utilizados nos estudos eletroquímicos, sistema com dois eletrodos (a), três eletrodos (b) e quatro eletrodos (c).



Fonte: Adaptado de Grossi; Riccò (2017).

3.3.1 Classificação dos métodos eletroanalíticos

Conforme o sinal mensurável, os métodos eletroanalíticos são categorizados em potenciométricos, coulométricos, voltamétricos e impedimétricos. Na potenciometria, são utilizados dois eletrodos (referência e indicador) em uma célula eletroquímica simples, registrando o potencial entre os dois eletrodos para fornecer informações sobre a concentração da amostra. Alterações de potencial (em relação ao eletrodo de referência) são correlacionadas com as alterações do analito alvo quando a corrente é nula (Ding; Qin, 2020).

Nas análises de coulometria, as medições são realizadas por eletrólise exaustiva do analito, aplicando potencial constante em uma superfície do eletrodo de

trabalho (ET) em relação a um eletrodo de referência (ER). Embora o uso de titulações coulométricas seja comum em medições de amostras, a coulometria de potencial constante não está sujeita aos efeitos de interferentes, pois o potencial do ET é controlado em um valor onde apenas uma reação eletroquímica é gerada (Majeed, et al., 2022; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

A EIE é uma técnica eletroquímica importante que consiste na medição da impedância de um circuito medido em ohms. Comparada a outras técnicas, a EIE apresenta várias vantagens, como ser estacionária, usar a análise de pequenos sinais e ser capaz de sondar relaxações de sinal em uma ampla faixa de frequência (100 MHz a mais de 100 kHz), utilizando estações de trabalho eletroquímicas (potenciostato/galvanostato) (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

3.4 ELETROQUÍMICA

3.4.1 Voltametrias

O termo voltametria deriva da palavra “voltamperometria”, que expressa uma corrente medida em função do potencial aplicado ($I = f(E)$), e a curva resultante é denominada de Voltamograma. Muitas áreas da química eletroanalítica utilizam técnicas voltamétricas, incluindo a polarografia, que foi fundamental para o desenvolvimento de outras técnicas como a voltametria de varredura linear, pulso diferencial e cíclica (Costentin; Fortage; Collomb, 2020).

A finalidade e qualidade das informações obtidas, bem como o processo de interação do analito com o eletrodo, definem a escolha da técnica de voltametria adequada. Para realização dessas técnicas, são necessários pelo menos 2 eletrodos. Com base na estrutura/tipo do eletrodo e tipo do eletrólito utilizado, e como o potencial é aplicado e a corrente medida, a técnica de voltametria pode ser definida (Costentin; Fortage; Collomb, 2020). Será descrita brevemente a análise da voltametria cíclica abaixo, utilizada neste trabalho apenas no processo de síntese do filme de nanotubos de carbono.

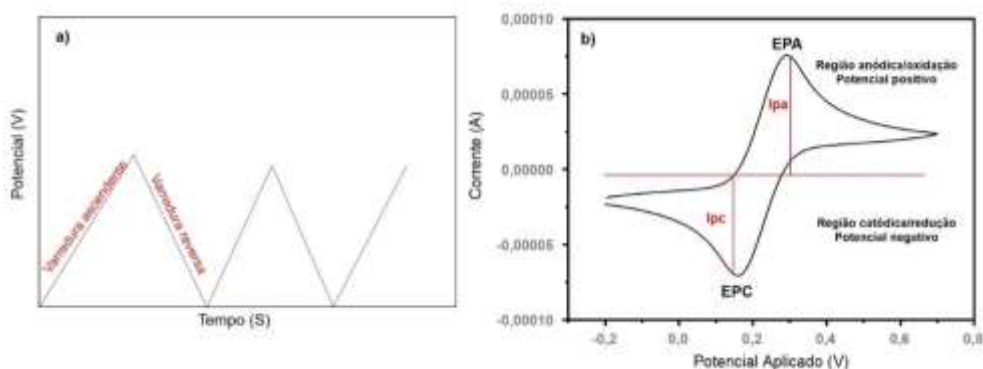
Voltametria cíclica é uma técnica semelhante à polarografia, todavia, o potencial é aplicado em uma direção e retorna. É uma das técnicas mais utilizadas nas áreas da química, permitindo obter informações sobre a proporção de elétrons

transferidos entre as substâncias e os eletrodos, estimar a área de superfície relativa, avaliar a falta de eletrólitos na interface eletrodo/eletrólito e determinar a natureza dos processos químicos em conjunto com a transferência de elétrons (Avelino et al., 2021).

A VC é aplicada no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos devido à sua capacidade de analisar a integridade das camadas moleculares na superfície do eletrodo de trabalho. É necessário minimizar a migração dos íons eletroativos gerada pelo campo elétrico, e o íon ferricianeto pode ser usado como sonda redox, pois é um eletrólito inerte. A combinação do solvente, eletrólito e material específico do ET define o limite de potencial. A corrente gerada em uma célula eletroquímica pela ciclagem de potencial do ET é mensurada e a curva resultante é denominada voltamograma cíclico (Avelino, et al., 2021; Costentin; Fortage; Collomb, 2020).

A voltametria analisa a relação entre a voltagem, corrente e o tempo durante o processo de eletrólise em uma célula eletroquímica. Em um experimento voltamétrico, após aplicado o potencial em um valor inicial, ocorre a redução do composto em soluções mais negativas (catódicas), gerando um pico de corrente proporcional a concentrações deste composto (Figura 6a). Depois que o potencial atinge o valor em que a reação de redução ocorre, o potencial é variado no sentido contrário, gerando uma reação de oxidação (anódica) até o valor inicial (Figura 6b) (Avelino, et al., 2021; Da silva-junio et al., 2022b).

Figura 6 a-b: Aplicação do potencial em uma voltametria cíclica (a); voltamograma cíclico obtido em um sistema reversível (b).



Fonte: Próprio autor, 2023.

A varredura geralmente segue um padrão semelhante a um triângulo isósceles, no qual esse formato permite observar que o produto da reação redox ocorrida na primeira etapa de varredura (ida) pode ser avaliado novamente na varredura reversa (volta). A VC é uma ferramenta amplamente utilizada em estudos exploratórios e pode ser aplicada para caracterizar o comportamento redox de compostos, determinar os processos químicos que precedem ou sucedem as reações eletroquímicas, bem como avaliar a cinética de transferência de elétrons e realizar análises quantitativas (Avelino, et al., 2021; Da silva-junio et al., 2022b).

Alguns parâmetros são utilizados para avaliar os resultados da VC. O parâmetro ajustado, representado pelo potencial (E), e o medido, que é a corrente resultante (i). A corrente em função do potencial gera um voltamograma a partir da corrente obtida via transferência de elétrons durante o processo de oxirredução (Equação 1), o qual é diretamente proporcional à quantidade de amostra presente na superfície do eletrodo que está imerso em uma célula eletroquímica (Avelino, et al., 2021; Da silva-junio et al., 2022b).



Eq. 1

Sendo O à forma oxidada da espécie eletroativa, R a forma reduzida e ne^- o número de elétrons envolvidos no processo de oxirredução.

3.4.2 Espectroscopia de impedância

A Espectroscopia de Impedância (EI) é uma técnica utilizada para caracterizar as propriedades elétricas de materiais, sejam eles de natureza ôhmica ou não, e suas interfaces. Ela permite a realização de medições tanto em sólidos quanto em eletrólitos. A forma mais comum de empregar a técnica de EI envolve a obtenção direta de dados no domínio da frequência, por meio da aplicação de um potencial de frequência monocromática à interface e subsequente registro do deslocamento da fase, bem como da amplitude (parte real e imaginária, respectivamente) da corrente resultante naquela frequência (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

A impedância é compreendida a partir das resistências e reatâncias identificadas enquanto a corrente circula pelo circuito composto por resistores,

capacitores ou indutores. A representação gráfica em que a parte imaginária da impedância varia em relação à parte real é conhecida como gráfico de Nyquist. Quando a magnitude e a fase da impedância são relacionadas à frequência, o gráfico é chamado de Bode. Cada ponto presente no gráfico de Nyquist corresponde à impedância em uma frequência específica (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

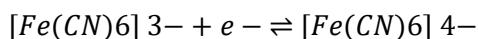
A impedância é definida como uma magnitude complexa. Ela é categorizada como estritamente real quando a fase é zero, levando à expressão $Z(w) = Z'(W)$, indicando um comportamento puramente resistivo. Nestas condições, a impedância permanece constante em função da frequência. No entanto, em situações em que Z' é uma função dependente da frequência, as relações estabelecidas por Kramers garantem que Z'' não seja nula em todas as frequências, mas sim que varie conforme a frequência (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

3.4.2.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), também conhecida como método de impedância de corrente alternada, é uma técnica que se baseia no domínio da frequência. O sistema impedimétrico pode ser visto como uma combinação de elementos em um circuito passivo, composto por resistência, capacitância e indutância. Nessa configuração, quando uma corrente é aplicada aos elementos, a corrente resultante é obtida utilizando a lei de Ohm. A EIE utiliza a aplicação de um potencial de corrente alternada (AC) em função do tempo para medir a corrente gerada (Majeed, et al., 2022).

Essa técnica permite avaliar a interação entre moléculas no desenvolvimento de biossensores, analisando a variação das correntes geradas durante as etapas de montagem e biointeração com o analito. Existem duas abordagens comuns desta técnica: Faradaicas e não-Faradaicas. No método não-Faradaico, não ocorre a transferência de elétrons entre os eletrodos; o objetivo é detectar mudanças de capacitância na dupla camada elétrica (CDE) próxima à superfície do ET, podendo ser usada para detectar a ligação de biomarcadores aos eletrodos funcionalizados com elementos de bioreconhecimento (Kemp, 2021).

Por outro lado, as abordagens Faradaicas utilizam eletrólitos contendo uma alta concentração de espécies redox (redução-oxidação), que, impulsionadas por uma tensão aplicada, sofrem reações eletroquímicas reversíveis e aumentam a transferência de elétrons via interface eletrólito-eletródo (Kemp, 2021). A sonda redox comumente usada é o ferro/ferricianeto $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, que passa pela seguinte reação:



Eq. 2

Comparando-a com outras técnicas, a EIE traz vantagens, pois é uma técnica de estado estável que utiliza análise de pequenos sinais e pode sondar relaxações de sinal em uma faixa muito ampla de frequência aplicada, de menos de 100 mHz a mais de 100 kHz, utilizando estações de trabalho eletroquímicas comercialmente disponíveis (Potenciostato/galvanostato) (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

A impedância é a medida da capacidade que um circuito elétrico possui para resistir à passagem de corrente elétrica. As medidas são realizadas em uma faixa de frequências, separando os processos físicos e químicos por suas constantes de tempo. Quando a AC é aplicada a estes elementos, a corrente resultante é obtida pela lei de Ohm, que é aplicada a elementos resistivos e é dada pela razão entre a tensão aplicada (V) e a intensidade que a corrente (I) flui pelo elemento, conforme representado na equação abaixo (Lucena, et al., 2022; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

$$R = \frac{V}{I}$$

Eq. 3

A impedância pode ser representada graficamente, utilizando a relação de Euler para expressar a dependência do ângulo de fase por meio de funções trigonométricas (Lvovich, 2012; Spikes, 2020), resultando na seguinte equação:

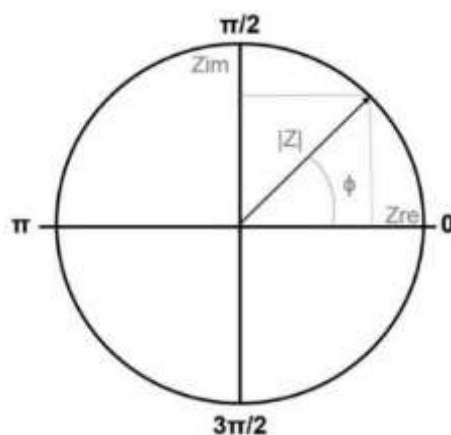
$$Z = |Z|(\cos\phi + j \sin\phi) = Z_{re} + Z_{im}$$

Eq. 4

A equação acima mostra que a impedância é um valor complexo, com partes real e imaginária (Z_{re} vs. Z_{im}), representando a projeção do módulo de impedância nos eixos de um sistema de coordenadas no plano cartesiano. Assim, a impedância pode

ser representada no plano complexo na forma de um vetor, também denominado de fasor (Fig. 7) (Spikes, 2020; Habekost, 2021; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

Figura 7: Representação do vetor (fasor) da impedância Z demonstrando as relações entre o complexo de impedância ($|Z|$), ângulo de fase (ϕ) e magnitude, Z_{re} e Z_{im} (eixo real e imaginário, respectivamente).



Fonte: Próprio autor, 2023.

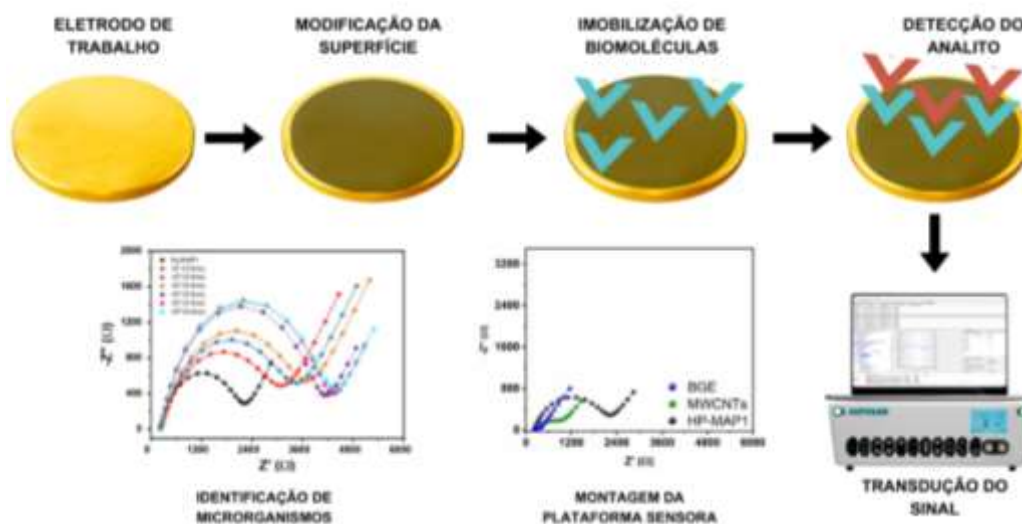
Os biossensores são dispositivos analíticos de diagnóstico capazes de medir a impedância de um sistema através de uma perturbação da corrente senoidal de pequena amplitude de sinal, aplicando um potencial na superfície do eletrodo de trabalho e apresentando propriedades resistivas e capacitivas. Sua principal característica é o uso da técnica de Espectroscopia de Impedância eletroquímica, onde os espectros de impedância são obtidos pela alteração na frequência em uma faixa determinada (Lu, et al., 2020).

Os métodos impedimétricos são considerados excelentes ferramentas por identificarem a transferência de elétrons em alta frequência e a transferência de massa em baixa frequência, além de monitorar a interação entre os elementos de bioreconhecimento imobilizados na superfície do eletrodo de trabalho e os analitos alvo. Esses métodos podem fornecer respostas quantitativas de parâmetros eletroquímicos (Malvano; Pilloton; Albanese, 2020; Strong, et al., 2021).

Diferentemente dos biossensores amperométricos e potenciométricos, os impedimétricos possibilitam a detecção direta de eventos de reconhecimento biomolecular sem o uso de marcadores, sendo chamados na literatura de

biossensores “label-free”. Esses biossensores requerem um biorreceptor específico que faça uma ligação direta com o analito, como DNA/RNA, anticorpos, aptâmeros (APTs), peptídeos e outros (Malvano; Pilloton; Albanese, 2020). Uma representação do funcionamento de um biossensor baseado na técnica de EIE é mostrado na figura 8:

Figura 8: Esquematisação geral sobre o princípio de funcionamento de um biossensor impedimétrico, antes e após a ligação com o analito.



Fonte: Próprio autor, 2023.

3.4.2.2 Circuito equivalente

Para ajustar os dados experimentais da impedância, empregam-se circuitos equivalentes, que são combinações de capacitores, resistores, indutores e outros componentes característicos em uma célula eletroquímica, distribuídos em série ou em paralelo. Um exemplo é o circuito equivalente de Randles (Fig. 9b), um dos mais utilizados para células em soluções aquosas, condutoras e iônicas. Esse circuito é empregado para organizar os dados da EIE e determinar os valores dos parâmetros elétricos para a concentração do analito (Habekost, 2021; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

A estrutura do circuito de Randles envolve: R_{CT} = resistência à transferência de carga, ω = frequência angular, R_s = resistência da solução e Cdl = capacitância da

dupla camada elétrica. Os valores da impedância podem ser avaliados segundo as equações 5, 6 e 7 abaixo (Habekost, 2021; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021):

$$Z(t) = E(t)/I(t)$$

Eq. 5

$$Z' = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C^2 dl R_{ct}^2}$$

Eq. 6

$$-Z'' = \frac{\omega C dl R^2 ct}{1 + \omega^2 C^2 dl R^2 ct}$$

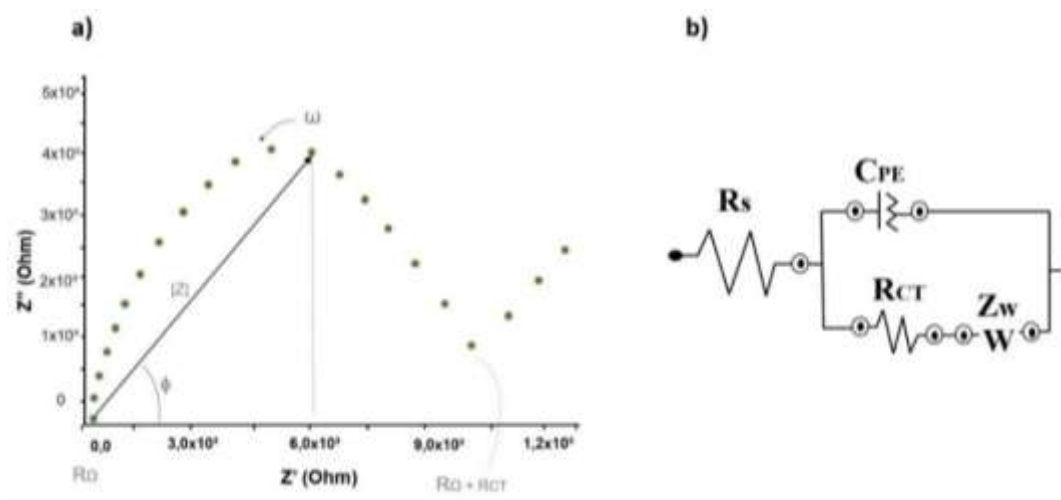
Eq. 7

Onde: R_s – resistência intrínseca da solução; R_{CT} – resistência à transferência de carga; ω – frequência angular; Cdl – capacitância de dupla camada elétrica.

As respostas elétricas (formato de semicírculos) são associadas com a resposta do circuito elétrico. O circuito escolhido é aquele cujo modelo matemático se ajusta ao resultado do gráfico de Nyquist, denominado circuito equivalente. O Diagrama de Nyquist é a equação utilizada habitualmente para representar o espectro da impedância, consistindo em uma série de pontos que representam a magnitude e a direção do vetor de impedância para uma frequência específica (Deusenbery; Wang; Shukla, 2021; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

Essas representações também são empregadas em simulações computacionais de impedâncias em sistemas variados. Nos experimentos eletroquímicos, a impedância é composta pelas componentes R_s , Cdl , R_{ct} e o elemento de Warburg (Z_w), conforme ilustrado no circuito representado na figura 9b. A combinação desses elementos é conhecida como circuito de Randles, sendo um dos circuitos mais amplamente utilizados em simulações com EIE (Deusenbery; Wang; Shukla, 2021; Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

Figura 9 a-b: Diagrama de Nyquist, (Z'') parte imaginária e (Z') parte real da impedância (a), Circuito equivalente de Randles (b).



Fonte: Próprio autor, 2023.

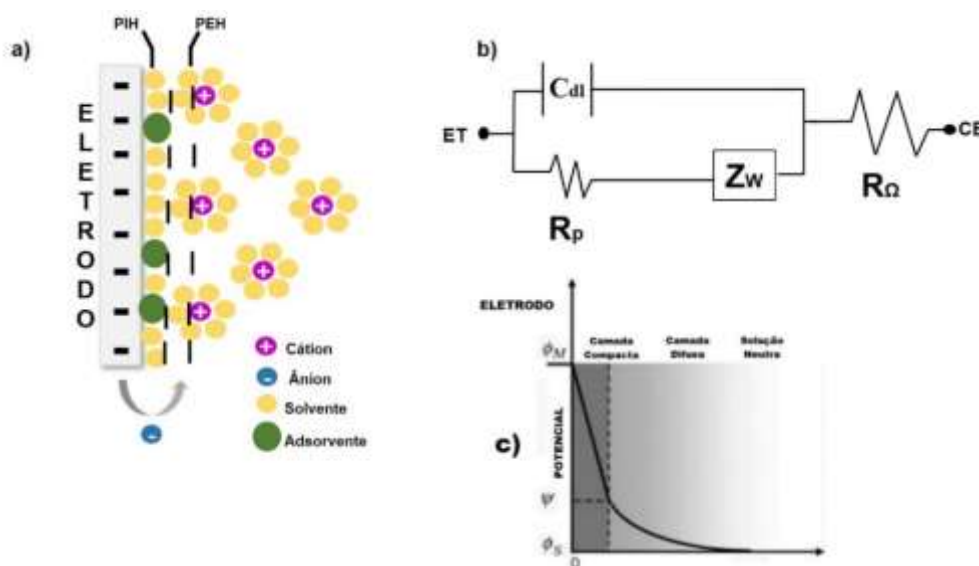
3.4.2.3 Dupla camada elétrica

A dupla camada elétrica (DCE) é uma camada na superfície dos eletrodos gerada a partir da movimentação de íons e suas interações eletrostáticas com dada superfície. A DCE se forma a partir de potenciais de Galvani existentes entre duas fases condutoras distintas, por exemplo, duas camadas paralelas com cargas de sinais opostos. A carga negativa de um eletrodo (Fig. 10a) é balanceada pelos cátions que se atraem para a superfície do eletrodo, enquanto os contra íons na solução eletrolítica distribuem-se em determinada distância do eletrodo (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

Dessa forma, a DCE é formada por uma camada compacta, chamada plano interno de Helmholtz (PIH) e a camada difusa chamada de Gouy-Chapman. O limite da extensão da camada difusa depende da concentração do eletrólito, logo, a dupla camada pode afetar a cinética dos processos eletroquímicos em determinados casos. Uma característica importante da DCE é a distância entre as duas camadas que a compõem, a qual pode ser muito pequena, atingindo o nível molecular entre 0,1 e 0,4 nm. A depender do ET usado, sugere-se que a espessura da DCE possa atingir 1 nm (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

O perfil potencial-distância através da DCE envolve dois seguimentos, um com aumento linear do PIH até o plano externo de Helmholtz (PEH) e outro com aumento exponencial com a camada difusa. Por meio desta variação e da força iônica do meio, a espessura da DCE pode se estender por mais de 10 nm. Quando a DCE é criada por uma interface eletrodo/solução se comporta como um capacitor, logo, outro caminho é fornecido para o fluxo da corrente concomitantemente ao processo de transferência eletrônica. Por meio disso, a impedância torna-se uma ferramenta excelente para caracterização das reações eletroquímicas do eletrodo (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

Figura 10 a-b: Interface onde o eletrodo é carregado negativamente (a); Elementos do circuito elétrico referentes à cada componente da interface (b); Variação do potencial elétrico na interface do eletrodo (c) (ET: eletrodo de trabalho; Cdl: capacitância de dupla camada elétrica; Rp: resistência de polarização; Zw: impedância de Warburg; Rs: resistência da solução; CE: contra eletrodo)



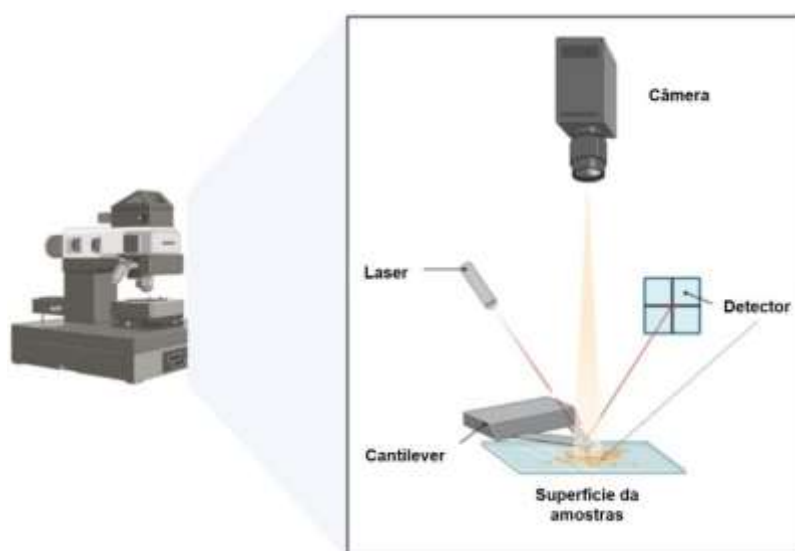
Fonte: Adaptado de Chang e Park, 2010.

Conforme citado, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos produzidos a partir da interação de células eletroquímicas formadas por três eletrodos, com um elemento sensor responsivo ao analito-alvo, afetando alguns processos previamente discutidos da DCE, torna-se imensamente essencial. Essas respostas são obtidas por meio da mudança da impedância eletroquímica, sendo este o método de transdução de sinal utilizado na produção deste trabalho.

3.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSENSORES

A técnica microscopia de força atômica (AFM) é empregada para análise de superfície, proporcionando uma alta resolução de estruturas atômicas e nanométricas. A geração de imagens no AFM ocorre pela interação de uma sonda sobre a superfície da amostra, onde se detectam as forças mecânicas universais presentes entre a ponta da sonda (microcantiliveres) e a amostra (figura 11).

Figura 11: Componentes de um microscópio de força atômica



Fonte: Adaptado de MOKOBI, 2023.

Essa técnica baseia-se na interação entre microcantiliveres e os átomos de uma amostra por meio de força de atração ou repulsão. A resultante dessas forças pode provocar aproximação e afastamento dos microcantiliveres, conduzindo assim o feixe de laser na frequência de ressonância da varredura. O feixe gerado pelo laser resultante é detectado pelo fotorreceptor e amplificados para um sinal elétrico. Os sinais elétricos das variações de posições e intensidades de luz produzidas pelas deflexões, são processados em um computador e convertidos em imagens topográficas (Deda, et al., 2013).

No desenvolvimento de biossensores, são utilizados microcantiliveres que conseguem varrer a superfície do sensor, identificando interações específicas entre biomoléculas no processo de detecção analítica. Esse processo ocorre devido os

microcantiliveres mudarem a sua frequência vibratória ou sofrerem deformação sobre moléculas na superfície do sensor. Essa mudança na frequência é detectada e pode ser usada para mensurar viscosidade, densidade e fluxo em vários sistemas (Deda, et al., 2013). A técnica de AFM é uma ferramenta importante na caracterização durante o desenvolvimento de sensores, visto que, a partir dela, pode-se observar modificações no relevo da superfície do biossensores durante cada processo de montagem do sistema, comparados com os resultados gerados pelas técnicas eletroquímicas (Canbaz; Sezgintürk, 2014; Singh, et al., 2014).

A microscopia é uma ferramenta suplementar ao processo de caracterização do biossensor, pois as técnicas eletroquímicas podem fornecer informações a respeito da variação de resposta elétrica do sistema durante todo o processo de construção do biossensor. A AFM auxilia na caracterização morfológica da superfície do sensor em todos os processos de montagem da plataforma e bioreconhecimento do analito (Canbaz; Sezgintürk, 2014; Singh, et al., 2014).

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta de caracterização de imagem típica e fornece informações detalhadas sobre a morfologia da superfície e composição da amostra (Ge, et al., 2020). A técnica se baseia na aplicação de um feixe focalizado de elétrons que escaneia a amostra e interage com os átomos da amostra fornecendo informações sobre a topografia e composição da superfície em tempo real para formação de uma imagem tridimensional, com alta resolução de cerca de 1-5 nm (Deena; Samuel; Roopan, 2019; Pallares-rusinõl, et al., 2023).

Uma esquematização do funcionamento do MEV é apresentada na Fig. 12. O feixe de elétrons passa através das bobinas de varredura, desviando o feixe nas direções vertical e horizontal para realização da varredura na superfície total. Os sinais gerados são detectados e amplificados com a ajuda de dispositivos eletrônicos, exibindo-os como imagens em um tubo de raios catódicos (Deena; Samuel; Roopan, 2019).

Figura 12: Componentes de um microscópio eletrônico de varredura



Fonte: adaptado de Moreira, et al., 2023

3.7 ESPETROSCOPIA INFRAVERMELHA COM TRANSFORMADA DE FOURIER

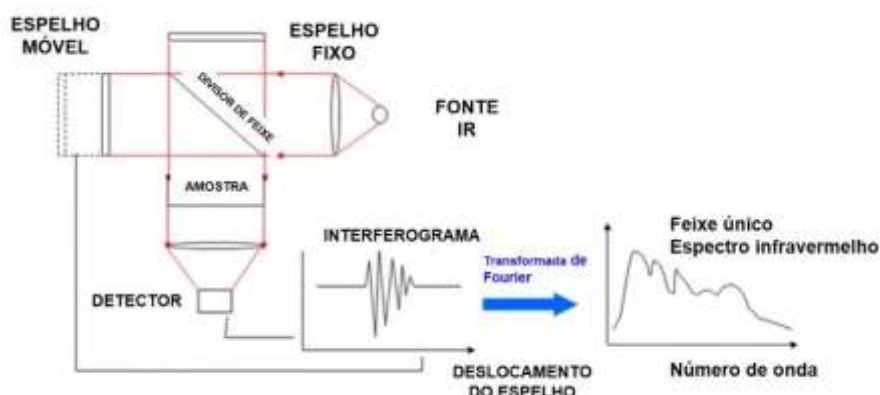
A espectroscopia infravermelha com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica utilizada para avaliação das interações entre as ligações químicas de um dado composto a partir de sua vibração. Essa vibração gera um espectro infravermelho de absorção ou emissão de amostras sólidas, líquidas ou gasosas. O espectro infravermelho atua como uma assinatura para cada amostra analisada. A técnica de FTIR destaca-se em detrimento dos métodos tradicionais de espectroscopia IR dispersiva, pois obtém o espectro a partir de um interferômetro. Subsequentemente, aplica-se um cálculo matemático chamado Transformada de Fourier, que converte os dados brutos no espectro (Magalhães; Goodfellow; Nunes, 2021).

Atualmente, a FTIR está amplamente difundida em áreas como a química de alimentos, a área clínica, entre outras. É um método simples, de baixo custo, não necessita de reagentes e é não destrutivo. O espectro IR é dividido em 3 sub-regiões: IR distante ($< 4000 \text{ cm}^{-1}$), IR médio ($4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$) e IR próximo ($13000\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$) das quais, para análises com amostras biológicas, aplica-se a região média. Além do uso da Transformada de Fourier, outra vantagem da técnica FTIR é a possibilidade de obtenção do espectro completo simultaneamente, ao contrário da espectroscopia IR dispersiva, onde a amostra passa por uma análise sequencial para geração do espectro (Magalhães; Goodfellow; Nunes, 2021).

Na região média, normalmente observam-se as assinaturas vibracionais dos principais grupos químicos presentes em lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e proteínas. A região existente entre $1800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ é denominada região da impressão digital, pois possui as vibrações primordiais de todos os compostos que caracterizam uma amostra específica. Nos ensaios com amostras biológicas, podem ser empregados três modos de amostragem: transflexão, transmissão e reflexão total atenuada (ATR), os quais ambos são aplicados na obtenção de espectros de células, tecidos e biofluidos (Magalhães; Goodfellow; Nunes, 2021).

Os modos de transflexão e transmissão atuam em uma pequena área da amostra e são não destrutivos, todavia, requerem preparação prévia do instrumento, da amostra, e apresentam baixa relação sinal-ruído (SNR). Em contrapartida, o ATR-FTIR é mais vantajoso do que os métodos de transmissão pela sua simplicidade de manuseio, alto SNR e alta resolução espacial. Além disso, a sua radiação IR é direcionada por um elemento de reflexão interna (IRE), apresentando alto índice de refração, e não diretamente pela amostra. Logo, a amostra precisa estar em contato direto com o IRE para que a radiação IR seja devidamente absorvida. Uma esquematização do funcionamento de um FT-IR é apresentado na fig. 13 (Magalhães; Goodfellow; Nunes, 2021).

Figura 13: Componentes de um equipamento de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier



Fonte: Adaptado de MEZZETTI; LEIBL, 2017.

3.8 NANOMATERIAIS

Os nanomateriais (NMs) são materiais que utilizam nanotecnologia e possuem pelo menos uma dimensão inferior a 100 nanômetros (nm). Eles ganharam evidência quando pesquisadores descobriram que seu tamanho influenciava nas propriedades físico-químicas, como as propriedades químicas, elétricas, mecânicas e ópticas. Podem ser classificados de acordo com sua dimensionalidade, morfologia, estado e composição química (Saleh, 2020).

Os nanomateriais baseados em carbono apresentam propriedades únicas e são aplicados em diversos campos interdisciplinares. O carbono é um alótropo de estado sólido que pode originar uma ampla variedade de estruturas, como o grafite, diamante, grafeno e nanotubos de carbono (Li, et al., 2019). Esses nanomateriais são formados por átomos de carbono sp^2 e sp^3 , hibridizados em várias dimensões. Apresentam propriedades químicas e físicas, como condutividade, estabilidade química, propriedades térmicas e mecânicas, dentre outras (Saleh, 2020).

3.8.1 Classificação quanto a dimensionalidade

Com base na sua dimensionalidade e conformação geral, os NMs podem ser classificados em quatro classes. Os nanomateriais de dimensão zero (0D) possuem todas as suas dimensões em nanoescala (abaixo de 100 nm), incluindo NMs esféricos, cubos, nanobastões, metais, pontos quânticos (QDs) e outros. Os nanomateriais unidimensionais (1D) têm uma dimensão não está em nanoescala, como filamentos ou fibras metálicas, nanotubos, nanofios, nanofibras, etc. Os bidimensionais (2D) apresentam apenas uma dimensão em nanoescala, incluindo filmes finos, nanoplacas, entre outros. Por fim, os materiais tridimensionais (3D) possuem várias dimensões além de 100 nm, como os favos de mel (Saleh, 2020).

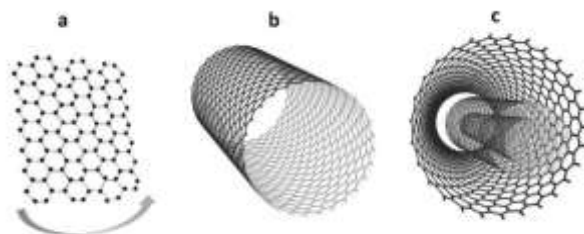
3.8.2 Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Os nanotubos de carbono (CNT) têm sido os nanomateriais de carbono mais pesquisados desde Sumio Iijima et al., 1991. São unidimensionais e apresentam estrutura oca formada por átomos de carbono hibridizados sp^2 dispostos em

estruturas hexagonais, seu diâmetro é cerca de 1 nm (figura 14a). Podem ser classificados como nanotubos de paredes simples (SWCNTs), formados por uma única folha de grafeno em formato de tubo (figura 14b), ou de múltiplas paredes (MWCNTs), formados por mais de uma folha de grafeno enroladas entre si. Os MWCNTs são consideravelmente maiores que os SWCNTs, com diâmetro geralmente entre 10-100 nm (figura 14c), (Li, et al., 2019).

No contexto da aplicação em biossensores, os MWCNTs se destacam devido à sua estrutura, pois possuem excelentes propriedades, como atividade eletrocatalítica, alta biocompatibilidade e rápida cinética de transferência de elétrons quando comparados com outros nanomateriais utilizados nesses dispositivos. Essas características são favoráveis e promissoras para o uso desses materiais no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (Li, et al., 2019; Saleh, 2020).

Figura 14: Demonstração da folha de grafeno (a), CNT de parede simples (B), CNT de múltiplas paredes (c).



Fonte: Adaptada de Ferrier, Honeychurch, 2021.

3.8.3 Aplicações em biossensores

Atualmente, os CNTs estão sendo aplicados em uma vasta gama de áreas. No campo dos biossensores, são exploradas suas propriedades físicas e químicas vantajosas. As altas áreas superficiais dos nanotubos e suas ótimas propriedades elétricas permitem a implementação das plataformas biossensores. Por exemplo, eles melhoram a imobilização de elementos de reconhecimento biológico e aumentam as áreas de superfícies ativas dos eletrodos de trabalho, além de melhorar a transferência de elétrons. Isso resulta em um aumento da sensibilidade e na diminuição dos limites de detecção dos biossensores (Ferrier; Honeychurch, 2021; Sanati, et al., 2023).

3.9 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são pequenos peptídeos moleculares com função na imunidade inata do hospedeiro contra diversos microrganismos, incluindo bactérias, fungos, parasitas e vírus (Lei, et al., 2019). O aumento da RAM configura um grave problema de saúde pública global devido ao crescente número de doenças infecciosas, tornando-se cada vez mais difícil de tratar. Essa problemática impulsiona uma busca por novas opções de agentes contra os microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais (Souza e Silva, et al., 2022).

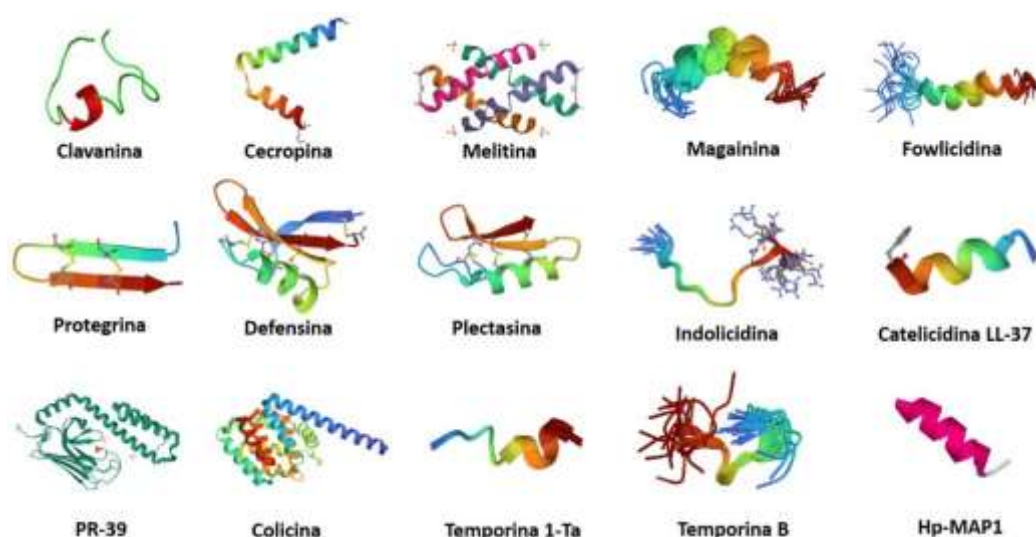
Os PAMs são compostos por pequenas sequências contendo de 12 a 50 resíduos de aminoácidos em sua composição. Geralmente são catiônicos, apresentando carga total entre +2 e +9 em pH fisiológico, e possuem estrutura anfipática, com mais de 50% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Esses peptídeos podem ser encontrados em vários tipos de organismos, como plantas, animais, insetos, microrganismos unicelulares, ou ainda serem sintetizados em laboratório (Souza e Silva, et al., 2022).

3.9.1 Tipos e características estruturais

Baseado em suas estruturas (Fig. 15), os PAMs podem ser classificados em quatro grupos: α -hélice (que formam hélices anfipáticas em membranas ou semelhantes), β -folha (normalmente estabilizados por pontes dissulfeto e possuem estrutura rígida), estrutura de peptídeo estendido e estrutura em loop (Souza e Silva, et al., 2022). Os PAMs α -hélice, como magaininas, clavaninas e cecropinas, são atualmente os mais estudados. Ainda que sejam classificados por sua estrutura, sua citotoxicidade é atribuída à tendência de formar a α -hélice, que pode apresentar uma superfície mais hidrofóbica (Zhang, et al., 2021). A nisina (N5-1) foi o primeiro PAM isolado de bactérias, apresenta citotoxicidade para outros tipos de bactérias quando produzida pela cepa hospedeira. Na indústria alimentícia, a nisina é amplamente utilizada como conservante natural devido à sua atividade antisséptica (Kitagawa; Otani; Inai, 2019).

As α e β -defensinas e protegrinas são exemplos de PAM β -folha e possuem quatro pontes dissulfeto, conferindo rigidez e estabilidade em meios aquosos. A tanatina é o principal representante do grupo dos PAM em loop, apresentando uma estrutura de 21 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos pertencentes ao grupo dos estendidos são ricos em prolina, arginina, histidina e/ou triptofano. Um exemplo é a estatina salivar, rica em histidina. No entanto, seu mecanismo de ação não é bem elucidado e muitos desses do grupo não são ativos em membranas (Zhang, et al., 2021).

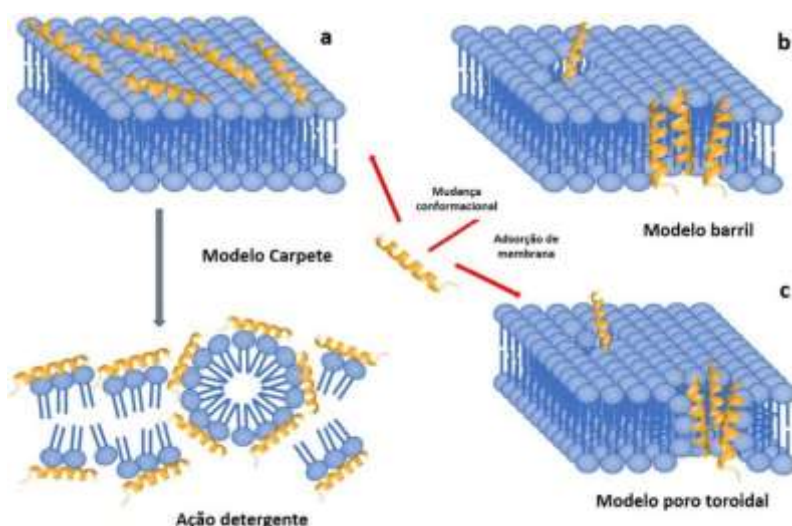
Figura 15: Estrutura 3D dos principais PAMs descritos atualmente na literatura



Fonte: PDB (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>).

A interação com membranas biológicas pode ser explicada pelos modelos de permeabilização de membrana (Fig. 16 a-c), que incluem o modelo de poro toroidal, formação de barril, formação de carpete e agregados. Cada modelo descreve um mecanismo específico pelo qual os peptídeos interagem com a membrana bacteriana, induzindo poros ou perturbações na estrutura lipídica. O modelo agregado envolve competição por cátions bivalentes e translocação dos peptídeos, oferecendo diferentes perspectivas sobre os processos de permeabilização da membrana. Essas abordagens estruturais são fundamentais para compreender os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (Huan, et al., 2020).

Figura 16 a-c: Esquematisação dos diferentes modos de ação descritos, carpete (a), barril (b), e poro toroidal (c).



Fonte: Adaptado de Huan, et al., 2020.

3.9.2 Modo de interação com membranas biológicas

Os peptídeos antimicrobianos têm a capacidade para interagir com fosfolipídios, especialmente devido às suas propriedades anfipáticas, que permitem a interação com as membranas biológicas presentes em microrganismos. Sendo assim, sua atividade antimicrobiana é regida por aspectos estruturais moleculares interdependentes, como a conformação estrutural, hidrofobicidade, carga, anfipaticidade e ângulo polar (Huan, et al., 2020).

3.9.2.1 Hidrofobicidade

A atividade e seletividade dos PAMs são características baseadas na hidrofobicidade, que é a percentagem de resíduos hidrofóbicos dentro do peptídeo, sendo em geral, cerca de 50% nos PAM. Este parâmetro determina a extensão da partição do peptídeo que entrará no núcleo hidrofóbico da membrana da bactéria. Pesquisas indicam que essa característica é determinante para a variedade de células-alvo de um PAM, onde o aumento da taxa de hidrofobicidade pode aumentar o número de alvos de dado peptídeo. No entanto, apesar de suas propriedades benéficas, a anfipaticidade é considerada mais importante que a hidrofobicidade no

estudo da ligação com membranas de microrganismos (Huan, et al., 2020; Tan; Fu; Ma, 2021).

3.9.2.2 Carga

A maioria dos PAMs catiônicos estudados apresenta carga positiva variando entre +2 e +9. Essa cationicidade desempenha um papel fundamental nas interações eletrostáticas iniciais entre os PAMs e as membranas fosfolipídicas dos microrganismos, como as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Essa afinidade eletrostática conferida pelos peptídeos os torna seletivos para esses patógenos em comparação com as células do hospedeiro (Huan et al., 2020; Souza e Silva et al., 2022).

3.9.2.3 Anfipaticidade

Define-se como a proporção relativa e distribuição de resíduos ou domínios hidrofóbicos e hidrofílicos presentes. É possível medi-la a partir do momento hidrofóbico, que é calculado como uma soma vetorial da hidrofobicidade de um aminoácido individual normalizado em uma hélice ideal. A mais comum é a α -hélice anfipática, possui de 3-4 resíduos e uma interação destaque com as membranas anfipáticas (Huan, et al., 2020).

3.9.2.4 Ângulo polar

É a proporção relativa das facetas polar e não polar do PAM em conformação de hélice anfipática. Em um exemplo hipotético, a segregação entre os domínios, com uma faceta de resíduos hidrofóbicos e outra de resíduos carregados, gera um ângulo polar de 180° . A fim de reduzir esse ângulo, indicando uma maior mistura entre os resíduos, duas estratégias podem ser adotadas: diminuir a segregação entre os domínios ou aumentar a proporção de resíduos hidrofóbicos na hélice. Essas abordagens objetivam promover uma melhor distribuição de resíduos ao longo da hélice e favorecer as interações estruturais que diminuem o ângulo polar (Doria, 2021; Huan, et al., 2020).

3.9.2.5 Áreas de aplicação

Os PAMs estão em evidência em diversas áreas, por exemplo em virtude de sua capacidade de regular reações pró-inflamatórias, recrutar células, matar células cancerígenas. Na área médica, as α -defensinas HNP-1, HNP-2 e HNP-3 são amplamente estudadas e mostram atividade antibacteriana (Da silva; Carvalho; Ribeiro, 2023). A indústria alimentícia também demonstra interesse no uso de PAMs, pela sua capacidade de inibição do crescimento de algumas bactérias, possibilitando a fabricação de produtos com maior durabilidade e menos conservantes sintéticos (Anumudu, et al., 2021).

A indústria farmacêutica tem particular interesse nos PAMs devido à urgência na descoberta de novas classes de antibióticos, além do interesse na capacidade de alguns peptídeos poderem matar bactérias que são multirresistentes. Além das áreas citadas, na área da nanotecnologia, biossensores para diagnósticos que utilizam peptídeos antimicrobianos como elementos de reconhecimento biológico vêm crescendo consideravelmente, como por exemplo os biossensores eletroquímicos desenvolvidos por (Malvano; Pilloton; Albanese, 2020) e (Da silva-junio et al., 2022b).

3.9.3 Temporinas

As temporinas são um tipo de peptídeo identificados inicialmente nos extratos de metanol da pele dos sapos asiático *Rana arythraea* e dos sapos híbridos europeus *Rana esculenta* (reclassificado como *Pelophylax lessonae/ridibundus*). Classificam-se como peptídeos do tipo *Vespa* pela sua semelhança com a sequência de peptídeos quimiotáticos isolados do veneno de vespas do gênero *Vespa* (Conlon, 2008; Ong; Ismail; Shahrudin, 2021). Em 1996, um grupo formado por 10 peptídeos estruturalmente relacionados com propriedades antimicrobianas foi descoberto por Simmaco et al. (1996).

Foram isolados de secreções da pele do sapo vermelho europeu *Rana temporaria* e designados como temporinas (A – L), atualmente classificadas como 1Ta – 1TI (Conlon, 2008). Hoje, a família das temporinas possui mais de 121 isoformas diferentes, alguns contendo até 17 aminoácidos (aa), todavia, as

temporinas classificam-se entre os menores peptídeos antimicrobianos, possuindo de 10-14 resíduos de aa, com uma carga líquida positiva baixa em pH neutro (0 a +3), devido à presença de apenas 1 ou 2 resíduos básicos na sua sequência. Seu caráter catiônico baixo é exclusivo quando comparados a outros PAMs. As temporinas são sintetizadas como precursores contendo um domínio N-terminal conservado que termina em lisina ou arginina (Mangoni, 2006; Zannella et al., 2022).

3.9.3.1 Temporina-PTa: propriedades e estrutura

O peptídeo Temporina-PTa (T-PTa) foi isolado inicialmente da pele do sapo de fogo da Malásia *Hylarana picturata* por Conlon, (2008b). É a única temporina encontrada nesta espécie de anfíbio, possui uma sequência com 13 resíduos de aminoácidos, amidação no C-terminal, estrutura alfa-hélice, com carga de +3 e hidrofobicidade de 61%, possui atividade antimicrobiana para a bactéria *Staphylococcus aureus* (Mishra; Wang, 2012).

3.9.4 Peptídeo *Hylarana picturata* Multiatividades 1 (Hp-MAP1)

O peptídeo *Hylarana picturata* Multiatividades Antimicrobiana 1 (NH₂ - AAGKVLKLLKKLL-COOH) é um peptídeo sintético derivado do T-PTa (NH₂ - FFGSVLKLIPKIL-COOH) pertencente ao grupo das temporinas. Apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e atividade antibiofilme (Souza e Silva et al., 2022).

O processo de síntese do Hp-MAP1 envolveu a troca dos aminoácidos Serina4 e Prolina10 (da T-PTa) por lisinas, pois representavam um resíduo polar não carregado e um resíduo quebra de α -hélice, respectivamente. Além disso, foram adicionados resíduos de alanina no terminal N para auxiliar a extensão do segmento α -helicoidal, e resíduos de isoleucina foram substituídos por resíduos de leucina visando reduzir a hidrofobicidade. Demonstra-se que o aumento de resíduos carregados positivamente foi benéfico para as interações eletrostáticas iniciais entre os PAMs e as membranas bacterianas carregadas negativamente, implementando a capacidade de seletividade do PAM (Jia, et al., 2020; Liscano, et al., 2019; Souza e Silva, et al., 2022).

O Hp-MAP1 é um peptídeo sintético inovador utilizado neste trabalho na construção de um biossensor eletroquímico para detecção de bactérias de interesse clínico. Um trabalho anterior utilizando o T-PTa demonstrou a especificidade e seletividade dos peptídeos derivados do grupo das Temporinas no desenvolvimento de biossensores como ferramentas complementares ao diagnóstico microbiológico (Da silva-junio, et al., 2022b; Pan, et al., 2024).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) carboxilados, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-Hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Ferri ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) foram obtidos da VETEC (Brasil).

As bactérias utilizadas neste estudo foram preparadas em ágar Mueller-Hinton a 37°C por 24h, e posteriormente distribuídas em solução salina em diferentes concentrações (10^1 a 10^7 UFC/mL) conforme a escala de McFarland (ANDRADE, et al., 2015). Todos os materiais foram previamente esterilizados, os demais produtos e reagentes químicos foram utilizados sem purificação posterior. Em todas as etapas dos experimentos foi usada água deionizada obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q plus (Billerica, EUA).

4.2 SÍNTESE DO PAM HP-MAP1

O peptídeo *Hylarana picturata* multiatividade 1 (Hp-MAP1) foi adquirido da Aminothech Company (Brasil). O processo de síntese ocorreu pelo método de fase sólida utilizando o N-9-fluorenylmethoxycarbonil (Fmoc), a purificação utilizou o método de fase reversa de alta performance por cromatografia líquida (RP-HPLC) com >95% de pureza, e confirmado por espectroscopia de massa por spray iônico.

4.3 MODIFICAÇÃO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA COM MWCNTS E PAM HP-MAP1

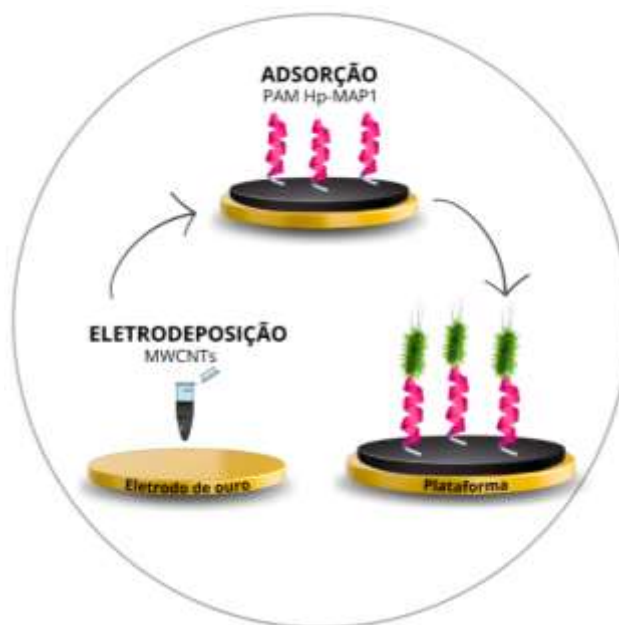
O eletrodo de trabalho com superfície de ouro ($\phi = 2$ mm) foi polido com movimentos circulares utilizando uma lixa de polimento e água deionizada, com a adição de alumina (Al_2O_3) como abrasivo. Após o polimento, o eletrodo foi cuidadosamente lavado várias vezes com água deionizada para remover todos os resíduos. Posteriormente, o eletrodo foi imerso em uma solução ácida (H_2SO_4 0.1 M), de 0,5 mg de MWCNTs para o processo de eletrodeposição, na qual as partículas

foram previamente dispersas utilizando CTAB (0,045 M) e banho ultrassônico. O CTAB foi empregado como surfactante catiônico para facilitar a dispersão dos MWCNTs na solução de eletrodeposição (Bolat, 2020). A eletrodeposição foi realizada com um potencial de varredura entre $-0,8$ V a $+1,2$ V (vs. Ag/AgCl), (10 ciclos, taxa de varredura = 100 mV.s^{-1}). Em seguida, para ativação dos grupamentos carboxila livres dos MWCNTs foi gotejado $4 \mu\text{L}$ dos agentes de acoplamento EDC-NHS (0,4 M e 0,1 M, proporcionalmente, 1:1, v/v) por 10 min (Andrade, et al., 2015).

Seguidamente, $2 \mu\text{L}$ do PAM Hp-MAP1 foi gotejado sob a superfície do eletrodo, o método utilizado foi a adsorção física por 30 minutos para secagem completa da superfície do eletrodo. Para as análises do analito alvo foi utilizada uma suspensão previamente preparada a 25°C em diferentes concentrações (10^1 a 10^6 UFC/mL) das cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), onde o eletrodo de trabalho com superfície modificada foi imerso por 5 min, e submetido às análises eletroquímicas.

Abaixo na fig. 17 é demonstrada uma representação esquemática do processo de modificação da plataforma biossensora.

Figura 17: Representação esquemática da plataforma sensora MWCNTs_Hp-MAP1.



Fonte: Próprio autor, 2023.

4.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Os dados eletroquímicos foram obtidos usando um Autolab PGSTAT302N potenciostato/Galvanostato (Ecochemie, Netherlands), interfaciado pelo software NOVA versão 1.8. Todos os experimentos foram executados usando 20 mL de PBS (pH 7.4) contendo 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1) usado como sonda redox. Medidas EIE foram conduzidas em uma célula eletroquímica convencional formada por três eletrodos: BGE como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl (KCl 3 M) como eletrodo de referência e fio de platina como contra eletrodo.

O espectro de impedância foi realizado na frequência de 100 mHz a 100 kHz, com amplitude de onda senoidal de potencial de 10 mV. Todas as medidas eletroquímicas foram executadas em duplicata em 25 °C no interior de uma gaiola de Faraday. O software OriginPro 9.0 foi utilizado para confecção dos gráficos e obtenção de dados matemáticos. A análise da estrutura morfológica da solução de eletrodeposição de MWCNTs foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM-5900, JEOL, Japan).

4.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A análise da composição morfológica e estrutural do biossensor foi feita por um microscópio de força atômica SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japan). Foram utilizados cantilevers com ponta de silício (Nanoworld, Japan, frequência ressonante = 190 kHz, força constante = 42 N.m⁻¹) no modo não contato, a 25°C ± 1 °C. As imagens obtidas foram processadas utilizando Gwyddion software. Todas as varreduras foram realizadas em triplicatas para verificar a reprodutibilidade das imagens obtidas.

4.6 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada na região IR média (1000 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹) com resolução de 2 cm⁻¹. Foi utilizado um espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Rowville,

Austrália) com diamante acessório de reflexão total atenuada (ATR) e amostragem de eletrodo de ouro.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise morfológica da solução de eletrodeposição (CTAB/MWCNTs) foi realizada através de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Tescan LYRA 3 e Tescan MAIA 3 equipados com um FEG (Tescan Ltd., Brno, República Tcheca) e detector EDX MAX 50 (Oxford Instruments plc, Abingdon, Reino Unido), operando com velocidade de aceleração de elétrons de 15 kV em temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), com ampliações de 50.000 e 100.000 vezes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLATAFORMA SENSORA MWCNTS_HP-MAP1

A imobilização dos MWCNTs e PAM Hp-MAP1 foi realizada através da modificação da superfície de ouro (BGE) do ET, conforme esquematizado na ilustração da plataforma sensora na Figura 18.

Figura 18: Esquematização da plataforma sensora MWCNTs_Hp-MAP1.



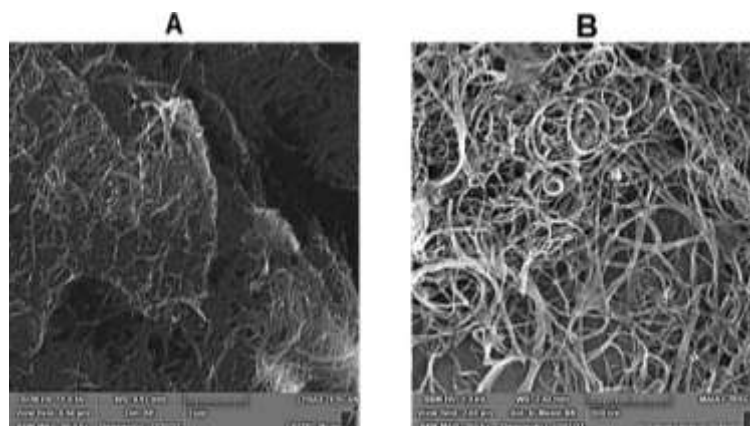
Fonte: Próprio autor, 2023.

5.2 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DAS ETAPAS DE MONTAGEM DO ELETRODO

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 19 demonstra que os MWCNTs estão distribuídos uniformemente na nanoestrutura em forma de fio. Estudos anteriores também observaram resultados semelhantes (Anshori, et al., 2021; Morsy, et al., 2014). Os MWCNTs foram analisados para avaliar suas propriedades físicas, incluindo tamanho e estrutura. As amostras foram examinadas sob ampliações de 50.000 e 100.000 vezes, gerando imagens detalhadas. Os MWCNTs apresentaram um diâmetro médio de aproximadamente 80,26nm com paredes compostas por várias camadas concêntricas de grafeno.

Figura 19 a-b: Avaliação da solução de eletrodeposição via MEV



Fonte: Autor Próprio, 2023.

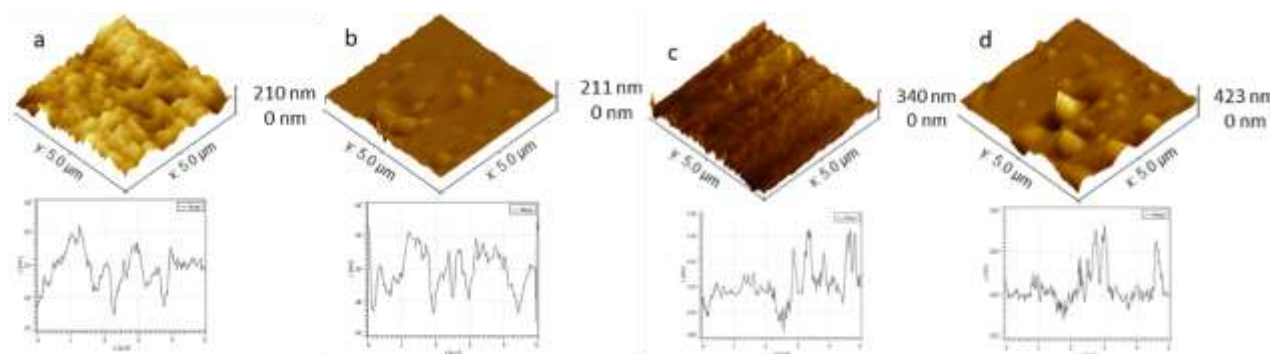
5.2.2 Microscopia de Força Atômica

A análise topográfica das etapas de montagem do biossensor e as mudanças na superfície após o processo de adsorção do Hp-MAP1 e bioreconhecimento das amostras de microrganismos foram avaliadas via AFM (Fig. 20). Os parâmetros de rugosidade média aritmética (R_a) e rugosidade média quadrática (R_{ms}) foram utilizados para quantificação da rugosidade das superfícies analisadas. Na Fig. 20a, observa-se a superfície do eletrodo após o processo de eletrodeposição dos MWCNTs, na qual formou-se uma camada condutora de aspecto áspero, com irregularidades e presença de vales e picos, com altura de 210 nm (R_a : 12.58 nm, R_{ms} : 19.33 nm), corroborando com estudos anteriores, como o trabalho de Chen, et al. (CHEN, 2023).

Após a adsorção do PAM Hp-MAP1 (Fig. 20b), observou-se uma uniformização da superfície com diminuição na rugosidade do perfil topográfico, além da diminuição dos vales e picos (R_a : 15.63 nm, R_{ms} : 21.54 nm), indicando sua adesão, em conformidade com estudo semelhantes, como o trabalho de da Silva-Junio et al (Da Silva-Junio, et al., 2022b). Após o contato com o patógeno Gram-positivo (*S. aureus*) (Fig. 20c), houve um aumento significativo na rugosidade e topografia do sistema sensor. O sensor revelou alterações morfológicas com altura de 340nm (R_a : 23.41 nm, R_{ms} : 31.29 nm) caracterizando o bioreconhecimento.

Em contrapartida, na interação com a bactéria Gram-negativa (*P. aeruginosa*) (Fig. 20d) a característica topográfica do sensor mudou, passando a apresentar vales e picos com altura de 423nm (Ra: 35.67 nm, Rms: 42.10 nm). A interação foi confirmada em todas as amostras pelas mudanças observadas na altura e topografia, demonstrando a capacidade de ligação do biossensores funcionalizado Hp-MAP1. O reconhecimento das bactérias Gram-negativas resultou em alturas maiores que o reconhecimento do grupo Gram-positivo. Resultados semelhantes foram relatados por Silva Junior, et al (Silva junior, et al., 2018).

Figura 20 a-d: Imagens 3D (5.0 μm x 5.0 μm) via AFM da topografia do processo de modificação da superfície do ET via eletrodeposição de MWCNTs (a), MWCNTs_Hp-MAP1 (b), interações com bactérias Gram-positiva (c) e Gram-negativa (d).

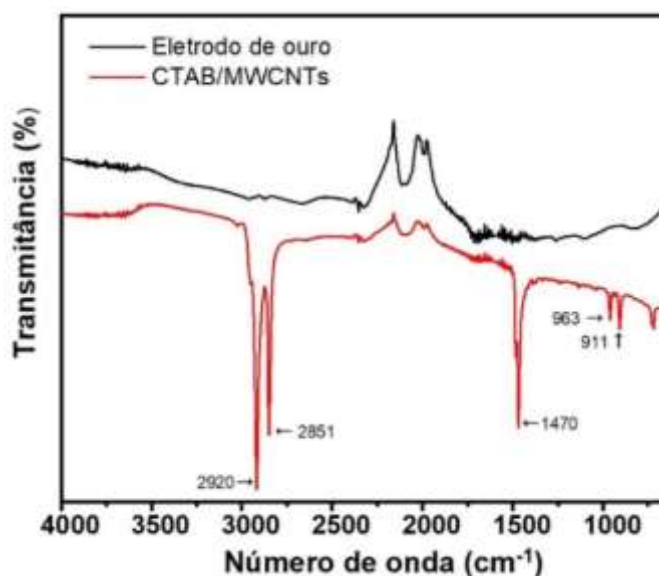


Fonte: Próprio autor, 2023.

5.3 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHA COM TRANSFORMADA DE FOURIER

As medidas foram realizadas na região média do espectro IR (4.000 a 1.000 cm^{-1}) a fim de avaliar a presença dos grupos funcionais. A Fig. 21 mostra os espectros de FTIR-ATR dos MWCNTs funcionalizados. O espectro FTIR apresentado exibe as bandas de absorção de 3000-3500 cm^{-1} atribuíveis à vibração de estiramento da ligação OH (Kim; Shin; Park, 2024). O pico de absorção de 2920-2851 cm^{-1} resultou da assinatura vibracional do estiramento de dois grupos carbonila. O pico em 1470 cm^{-1} é atribuído ao estiramento do grupo C=O (Silva junior, et al., 2018). Os picos fortes na região de 963-911 cm^{-1} são atribuídos a um estiramento do grupamento C-O-C (Kim; Shin; Park, 2024), provavelmente devido à presença do uso do ácido cetiltrimetilamônio (CTAB) como surfactante.

Figura 21: Espectro FTIR-ATR da solução de MWCNTs.



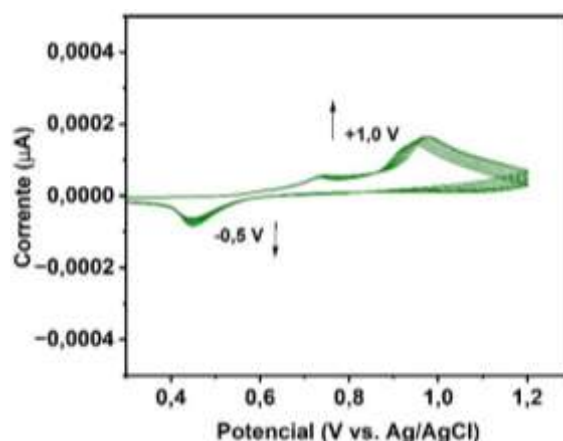
Fonte: Próprio autor, 2023.

5.4 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA SENSORA MWCNTS_HP-MAP1

O processo de modificação da superfície do ET (Fig. 22) por CTAB e MWCNTs em solução ácida (0,1 M H₂SO₄) foi realizada através da técnica de voltametria cíclica, onde foram aplicados 10 ciclos de deposição em uma faixa de potencial de varredura entre - 0,8 V a +1,2 V com uma velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. Na varredura inicial observou-se um pico de oxidação em +1,0 V (vs. SCE), e na varredura reversa, nota-se um pico gerado pelo processo de redução em -0,5 V (vs. SCE), conforme demonstrado no estudo de (Bolat, 2020). As respostas de corrente aumentaram progressivamente com as varreduras subsequentes. Ao final dos 10 ciclos de eletrodeposição, formou-se uma camada de MWCNTs na superfície do ET, que passou a ter uma coloração acobreada.

A utilização do surfactante CTAB permitiu a dispersão homogênea dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) na solução ácida, prevenindo a aglomeração dos MWCNTs, problema comum em água e solventes orgânicos (Bolat, 2020).

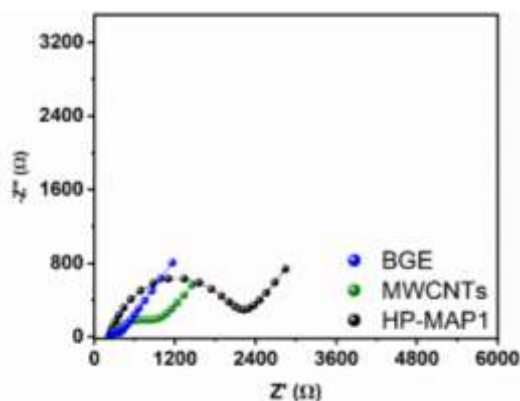
Figura 22: Voltamograma cíclico obtido durante processo de eletrodeposição do MWCNTs em 0,1 M $\text{L} - \text{H}_2\text{SO}_4$.



Fonte: Próprio autor, 2024.

As análises impedimétricas foram realizadas visando demonstrar as etapas de modificação da superfície do eletrodo de trabalho na fabricação do biossensor. Os espectros de impedância representados pelos Diagramas de Nyquist abaixo (Fig. 23) demonstram o padrão do eletrodo de trabalho limpo, cujo R_{CT} da curva é baixo, indicando baixa resistividade do sistema ($22 \Omega \pm 0.01$), o processo de eletrodeposição com MWCNTs, com aumento do R_{CT} ($742 \Omega \pm 0.42$), por fim a ativação dos grupos carboxílicos via EDC:NHS e adsorção do PAM Hp-MAP1 aminado, resultando em uma ligação amida na superfície do sensor, que demonstrou um aumento considerável no R_{CT} ($1840 \Omega \pm 0.015$).

Figura 23: Diagrama de Nyquist do processo de montagem do biossensor.



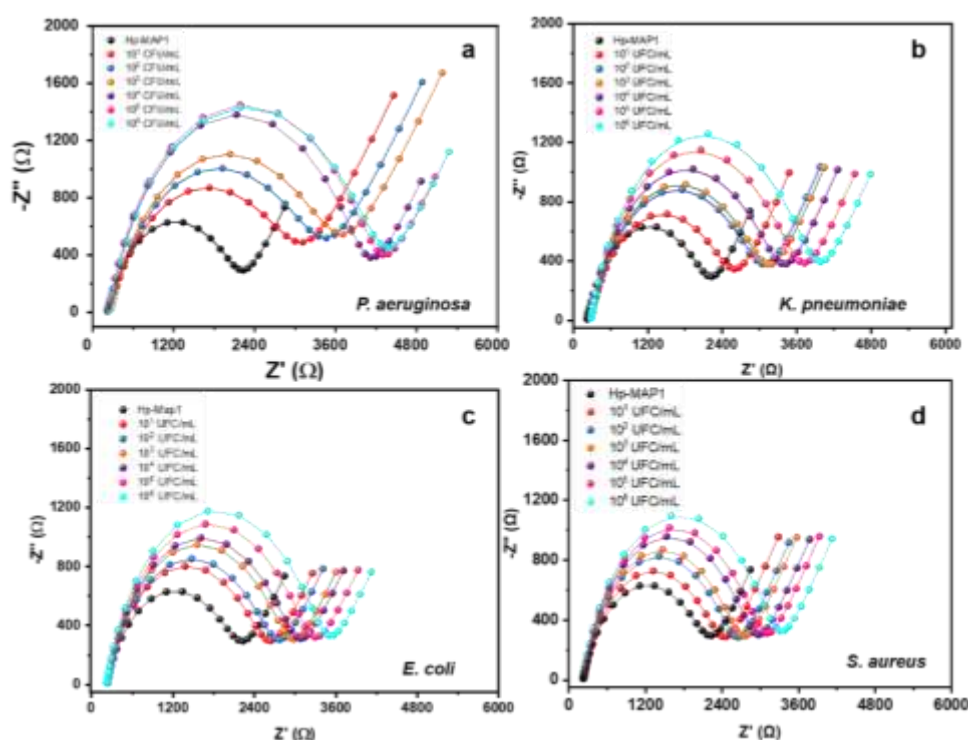
Fonte: Próprio autor, 2023.

5.4.1 Performance bioanalítica da plataforma sensora

A técnica de EIE é muito útil para estudar as alterações na superfície do eletrodo resultantes das etapas de modificação. Para avaliação da reação, um circuito equivalente é determinado a fim de facilitar o entendimento do comportamento da interface eletrodo-eletrólito, neste trabalho o circuito de Randles foi empregado. A Resistência a transferência de carga (R_{CT}) demonstrou alterações significativas (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021).

Os diagramas de Nyquist (Fig. 24 a-d) representam o bioreconhecimento da plataforma sensora testada frente as amostras bacterianas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), que foram escolhidas em virtude de sua alta prevalência em infecções causadas por microrganismos. Ao analisar as respostas impedimétricas das amostras bacterianas testadas pelo biossensor, observamos uma diferença significativa entre elas. Trabalhos anteriores demonstraram resultados semelhantes (da Silva-junio et al., 2022a; Silva junior, et al., 2018).

Figura 24 a-d: Diagramas de Nyquist do biossensor impedimétrico MWCNTs_Hp-MAP1 para a *P. aeruginosa* (a), *K. pneumoniae* (b), *E. coli* (c) e *S. aureus* (d).

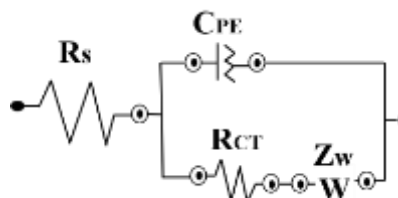


Fonte: Próprio autor, 2023.

Os resultados impedimétricos demonstram diferentes respostas para cada espécie bacteriana testada (Fig. 24 a-d), onde é possível observar que a interação do PAM Hp-MAP1 com os microrganismos gera um aumento nos diâmetros dos semicírculos de Cole-Cole (da Silva-junio, et al., 2022a). Os gráficos revelam um impedimento na transferência de carga na superfície do ET. Dessa forma, o processo de bioreconhecimento do Hp-MAP1 a cada microrganismo provoca uma elevação da resposta impedimétrica. Os experimentos com EIE foram conduzidos em duplicatas para determinação do intervalo de detecção do eletrodo e do tempo ideal de adsorção do PAM.

Cada elemento do circuito de Randles (Fig. 25) revela alguma informação sobre a reação (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021). Na tabela 2 podem ser observados os parâmetros obtidos a partir do ajuste matemático das respostas impedimétricas dos microrganismos apresentados na Fig. 24.

Figura 25: Circuito equivalente de Randles.



Fonte: Próprio autor, 2023.

Tabela 2: Parâmetros obtidos da montagem da plataforma sensora após ajuste das respostas impedimétricas com o circuito equivalente de Randles.

Modificação do eletrodo de ouro	UFC/mL	R_{CT} (Ω)	R_s (Ω)	CPE (μF)	W	N	ΔR_{CT}
BGE	-	0.022 $\pm$ 0.013	0.285 $\pm$ 0.018	0.190 $\pm$ 0.074	0.123 $\pm$ 0.014	0.337 $\pm$ 0.045	-
MWCNTs	-	1.432 $\pm$ 42	0.260 $\pm$ 0.043	0.351 $\pm$ 0.023	0.178 $\pm$ 0.011	0.524 $\pm$ 0.056	-
Sensor MWCNTs_Hp-MAP1	-	1.940 $\pm$ 0.015	0.219 $\pm$ 0.017	0.637 $\pm$ 0.010	0.124 $\pm$ 0.0139	0.832 $\pm$ 0.04	-

Fonte: Próprio autor, 2023.

Tabela 3: Parâmetros obtidos das interações com os microrganismos alvo.

Microrganismo	UFC/ mL	R _{CT} (Ω)	R _s (Ω)	CPE (μF)	W (μF)	N	Δ R _{CT}
<i>P. aeruginosa</i>	10 ¹	2.780 ± 0.021	0.243 ± 0.056	0.428 ± 0.060	0.598 ± 0.213	0.712± 0.021	52.18
	10 ²	2.950 ± 0.098	0.252 ± 0.070	0.328 ± 0.109	0.536 ± 0.281	0.754± 0,048	64.43
	10 ³	3.320 ± 0.183	0.255 ± 0.056	0.285 ± 0.067	0.541 ± 0.308	0.766± 0.045	87.84
	10 ⁴	3.750 ± 0.120	0.245 ± 0.098	0.277 ± 0.068	0.773 ± 0.31	0.77 ± 0.046	108.8
	10 ⁵	3.810 ± 0.084	0.250 ± 0.021	0.204 ± 0.028	0.661 ± 0.169	0.767± 0.024	110.7 1
	10 ⁶	3.820 ± 0.098	0.233 ± 0.100	0.171 ± 0.013	0.977 ± 0.115	0.078± 0.026	111.8
<i>K. pneumoniae</i>	10 ¹	2.270 ± 0.070	0.266 ± 0.019	0.477 ± 0.036	0.913 ± 0.061	0.715± 0.076	28.77
	10 ²	2.710 ± 0.014	0.278 ± 0.024	0.361 ± 0.038	0.879 ± 0.0300	0.75 ± 0.108	47.01
	10 ³	2.790 ± 0.049	0.273 ± 0.035	0.330 ± 0.017	0.884 ± 0.0321	0.712± 0.028	53.81
	10 ⁴	3.020 ± 0.070	0.270 ± 0.010	0.274 ± 0.014	0.897 ± 0.0304	0.73 ± 0.028	64.16
	10 ⁵	3.320 ± 0.042	0.271 ± 0.025	0.238 ± 0.015	0.923 ± 0.0247	0.758± 0.052	79.13
	10 ⁶	3.570 ± 0.0120	0.278 ± 0.010	0.210 ± 0.012	0.926 ± 0.0307	0.754± 0.035	89.75
<i>E. coli</i>	10 ¹	2.320 ± 0.021	0.218 ± 0.077	0.380 ± 0.011	0.121 ± 0.0436	0.786± 0.050	18.42
	10 ²	2.430 ± 0.042	0.234 ± 0.014	0.332 ± 0.010	0.116 ± 0.0446	0.789± 0.053	24.68
	10 ³	2.650 ± 0.070	0.221 ± 0.042	0.289 ± 0.077	0.120 ± 0.0264	0.751± 0.153	57.08
	10 ⁴	2.750 ± 0.042	0.221 ± 0.049	0.267 ± 0.035	0.118 ± 0.0236	0.857± 0.007	68.79

	10 ⁵	2.960 ± 0.084	0.225 ± 0.021	0.239 ± 0.014	0.118 ± 0.0286	0.867± 0.005	87.84
	10 ⁶	3.170 ± 0.021	0.219 ± 0.014	0.226 ± 0.012	0.120 ± 0.0133	0.827± 0.059	104.4 5
S. aureus	10 ¹	2.130 ± 0.049	0.227 ± 0.035	0.291 ± 0.067	0.946 ± 0.0408	0.782± 0.038	14.06
	10 ²	2.230 ± 0.077	0.220 ± 0.012	0.233 ± 0.027	0.984 ± 0.0241	0.759± 0.009	20.05
	10 ³	2.420 ± 0.070	0.220 ± 0.070	0.208 ± 0.011	0.948 ± 0.0669	0.76 ± 0.035	31.49
	10 ⁴	2.640 ± 0.035	0.221 ± 0.002	0.190 ± 0.008	0.962 ± 0.0679	0.773± 0.028	45.10
	10 ⁵	2.770- ± 0.021	0.223 ± 0.021	0.177 ± 0.0 07	0.943 ± 0.0666	0.779± 0.029	50
	10 ⁶	2.990 ± 0.056	0.220 ± 0.001	0.173 ± 0.003	0.960 ± 0.013	0.786± 0.019	60.62

Fonte: Próprio autor, 2023.

Tendo em vista os resultados descritos, observou-se que a identificação do grupo Gram-negativo em duplicata se destaca. Isso se deve à conformação anfifílica do PAM, que possui uma superfície catiônica (+4) (Souza e Silva, et al., 2022). O mecanismo de interação com bactérias do grupo negativo está relacionado a composição de sua membrana carregada negativamente com lipopolissacarídeo (LPS), quando comparado com as do grupo positivo que apresentam alta quantidade de ácido lipoteicoico (LTA) (Sohrabi, et al., 2023).

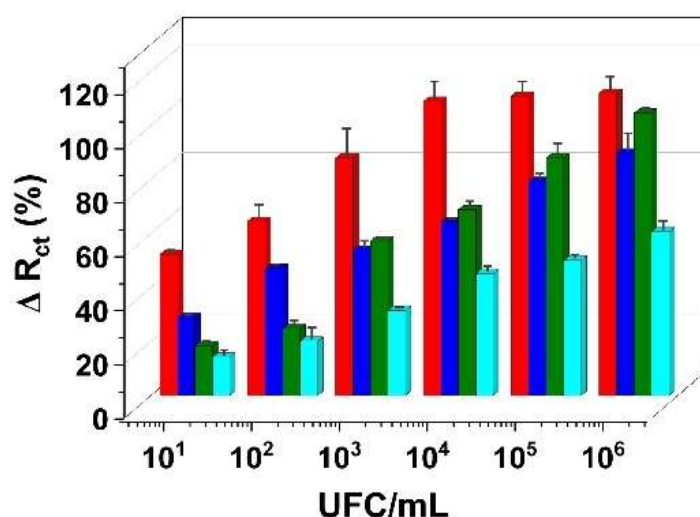
Em função disso, percebemos a necessidade de avaliar o sensor em termos de variação relativa do R_{CT} (ΔR_{CT}) a fim de caracterizar o desempenho analítico do biossensor, conforme a equação abaixo. Onde, $R_{CT(biossensor)}$ corresponde a resposta inicial do biossensor (MWCNTs_Hp-MAP1) e o $R_{CT(microrganismo)}$ é o valor da resistência à transferência de carga após o bioreconhecimento das bactérias *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus* (Lucena, et al., 2021).

$$\Delta RCT = \frac{RCT_{(microrganismo)} - RCT_{(biossensor)}}{RCT_{(biossensor)}} \times 100$$

Eq. 8

Os resultados estão representados graficamente abaixo (Fig. 26). É possível observar que conforme as concentrações dos microrganismos alvo aumentavam, um aumento no R_{CT} também acontecia, demonstrando uma relação entre a concentração e a cepa bacteriana testada.

Figura 26: Gráfico de barras com valores do ΔR_{CT} obtidos a partir dos experimentos com microrganismos dos grupos Gram-negativos e positivos, nas concentrações de 10^1 a 10^6 UFC/mL. *P. aeruginosa* (vermelho), *K. pneumoniae* (azul), *E. coli* (verde), *S. aureus* (ciano).



Fonte: Próprio autor, 2023.

A tabela 3 apresentada acima demonstra os valores de ΔR_{CT} , que apresentaram uma razão proporcional entre as concentrações dos microrganismos alvo e os valores obtidos do R_{CT} . Estes dados revelam respostas diferentes entre os tipos bacterianos (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus*), demonstrando que o biossensor proposto foi capaz de reconhecer as espécies bacterianas em baixas concentrações. O desempenho do biossensor para detecção dos patógenos alvo, foi avaliado a partir da variação relativa do R_{CT} , visto na equação 8 (Lucena, et al., 2022). Os dados utilizados para obtenção do ΔR_{CT} foram apresentados na tabela 3.

Os pontos dispersos representam os resultados experimentais e as linhas demonstram as curvas de encaixe do circuito de Randles. Vale salientar que as resistências obtidas foram diferentes entre os dois grupos bacterianos, revelando uma interação diferenciada do biossensor com cada grupo bacteriano. A partir do cálculo da relação linear dos dados extraídos das análises impedimétricas, o biossensor

apresentou uma excelente capacidade de bioreconhecimento, com limite de detecção (LOD) *P. aeruginosa* (0.60), *K. pneumoniae* (0.42), *E coli* (0.42) e *S. aureus* (0.59).

Conforme apresentado, nota-se uma relação direta entre a concentração e a cepa testada. O comportamento linear desse perfil de reconhecimento é explicado a partir das diferenças morfológicas e estruturais da composição das paredes celulares bacterianas. Logo, os valores de ΔR_{CT} para a bactéria *S. aureus*, conforme a literatura, permaneceram menores comparando com os resultados do grupo Gram-negativo (da Silva-junio, et al., 2022a; Silva junior, et al., 2018). Ao traçar a reta da curva de calibração, obteve-se um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,95.

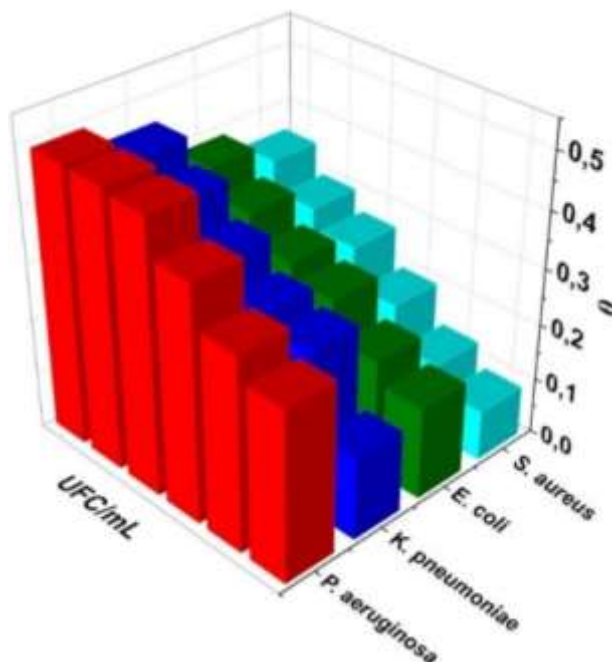
Para quantificação do estado de recobrimento da plataforma sensora (θ), podemos avaliar os sítios de ligação preenchidos pelas cepas bacterianas a partir da equação 9 abaixo:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT(biossensor)}}{R_{CT(bactéria)}}$$

Eq. 9

Onde $R_{CT(biossensor)}$ representa a RCT da plataforma sensora MWCNTs_Hp-MAP1 e $R_{CT(bactéria)}$, representa os valores de R_{CT} após a exposição as diferentes cepas bacterianas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 28. Sendo assim, nota-se que o aumento de θ está associado à quantidade de colônias nas cepas testadas, com destaque para o grupo Gram-negativo com maior crescimento. Conforme análise dos dados apresentados, sugere-se pela conformidade com os dados obtidos na avaliação do ΔR_{CT} . Desta forma pode-se afirmar que o sensor MWCNTs_Hp-MAP1 não só interage com as células bacterianas, como também demonstra respostas distintas e específicas conforme a composição da parede celular.

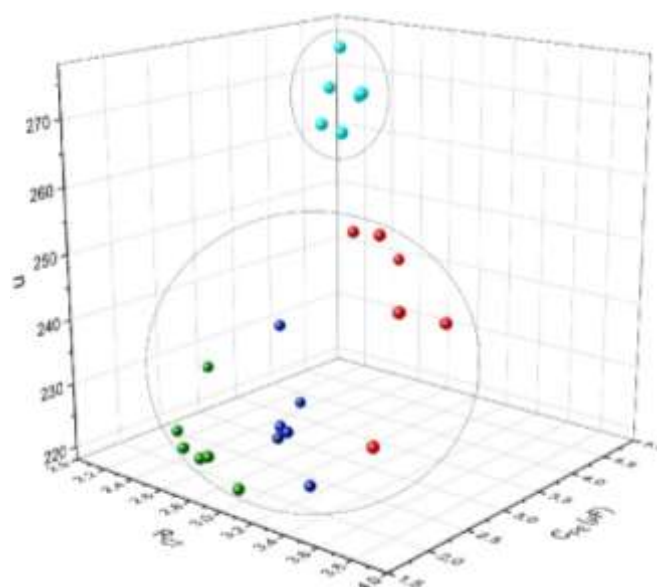
Figura 27: Grau de recobrimento do sensor (θ) após o reconhecimento bacteriano ($10^1 - 10^6$ UFC/mL).



Fonte: Próprio autor, 2023.

Pode-se observar os resultados obtidos na Figura 29, onde percebe-se um agrupamento das respostas correspondentes ao grupo bacteriano dos patógenos Gram-negativos (*P. aeruginosa* vermelho, *K. pneumoniae* rosa e *E. coli* verde). Já a amostra referente à *S. aureus* (azul), Gram-positiva se encontra distanciada. Outros estudos também demonstraram a afinidade de peptídeos catiônicos por microrganismos Gram-negativos em detrimento dos Gram-positivos (Sohrabi, et al., 2023). Destacamos que a plataforma biossensora desenvolvida foi capaz de analisar eletroquimicamente as reações de bioreconhecimento entre o PAM Hp-MAP1 e os microrganismos alvo.

Figura 28: Gráfico tridimensional referente aos valores de RCT, Q e N, obtidos como resultado do ajuste dos valores do circuito de Randles. Vermelho (*P. aeruginosa*), rosa (*K. pneumoniae*), verde (*E. coli*) e azul (*S. aureus*).



Fonte: Próprio autor, 2023.

6 CONCLUSÃO

Um biossensor eletroquímico impedimétrico inovador foi desenvolvido, baseado em monocamadas automontadas de MWCNTs e PAM Hp-MAP1. As análises microscópicas e eletroquímicas evidenciaram a eficaz imobilização das camadas na plataforma nanoestruturada, formando o biossensor MWCNTs_Hp-MAP1. O biossensor revelou alta sensibilidade para bactérias Gram-negativas, devido à sua carga negativa de superfície. Apresentou um ótimo limite de detecção de 10^1 UFC/mL, com tempo baixo de detecção (5 min), tornando-se um candidato promissor para o desenvolvimento de protótipos em dispositivos sensores.

Além disso, o ótimo desempenho do biossensor MWCNTs_Hp-MAP1 o torna um alvo para experimentos futuros com diversas espécies bacterianas, fungos, vírus e protozoários, comuns em infecções hospitalares, posicionando-o como uma alternativa diagnóstica promissora para a detecção rápida de microrganismos em áreas diversas, incluindo saúde clínica, indústria alimentícia e análises ambientais. Será necessário conduzir mais estudos que explorem aspectos fundamentais do biossensor, como o tempo de prateleira, a viabilidade de reutilização e a capacidade de miniaturização. Ensaio adicionais visando sua aplicação em testes clínicos, utilizando amostras de suor, saliva, líquido cefalorraquidiano e sangue, serão essenciais para aumentar sua validação analítica.

REFERÊNCIAS

AMARAL, E. M. F. et al. Sensores Eletroquímicos e Biossensores : Seus Princípios Básicos de Funcionamento e Algumas Aplicações. v. 15, n. 3, p. 1–18, 2023.

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

ANSHORI, I. et al. Functionalized multi-walled carbon nanotube/silver nanoparticle (f-MWCNT/AgNP) nanocomposites as non-enzymatic electrochemical biosensors for dopamine detection. **Nanocomposites**, v. 7, n. 1, p. 97–108, 2021.

ANUMUDU, C. et al. Recent advances in the application of the antimicrobial peptide nisin in the inactivation of spore-forming bacteria in foods. **Molecules**, v. 26, n. 18, 2021.

ARDISSON, L.; MIRANDA, M.; TEIXEIRA, C. Panorama epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde. **Cadernos Camilliani, Cachoeiro de Itapemirim – ES**, v. 15, n. 2004, p. 220–231, 2018.

ATANASOVA, K. Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs. 2010.

AVELINO, K. 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.

BAG, Sandip; MANDAL, Dibyendu. Overview of Biosensors and Its Application in Health Care. In: **Next Generation Smart Nano-Bio-Devices**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 29-60.

BEKMEZCI, S. A. et al. A new ethanol biosensor based on polyfluorene-g-poly(ethylene glycol) and multiwalled carbon nanotubes. **European Polymer Journal**, v. 122, n. October 2019, p. 109300, 2020.

BOLAT, G. Investigation of poly(CTAB-MWCNTs) composite based electrochemical DNA biosensor and interaction study with anticancer drug Irinotecan. **Microchemical Journal**, v. 159, 1 dez. 2020.

CANBAZ, M. Ç.; SEZGINTÜRK, M. K. Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection. **Analytical Biochemistry**, v. 446, n. 1, p. 9–18, 2014.

CASTLE, L. M. et al. Electrochemical Sensors to Detect Bacterial Foodborne Pathogens. **ACS Sensors**, v. 6, n. 5, p. 1717–1730, 2021.

CAVAILLON, J.-M.; LEGOUT, S. Louis Pasteur: Between myth and reality. **Biomolecules**, v. 12, n. 4, p. 596, 2022.

CESEWSKI, E.; JOHNSON, B. N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 159, p. 112214, 1 jul. 2020.

CHADHA, U. et al. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 109, p. 21–51, 2022.

CHANG, B.-Y.; PARK, S.-M. Electrochemical impedance spectroscopy. **Annual review of analytical chemistry** (Palo Alto, Calif.), v. 3, n. 1, p. 207–229, 2010.

CHEN, R. 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.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CHOWDHURY, A. D. et al. Electrical pulse-induced electrochemical biosensor for hepatitis E virus detection. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.

Conceição, P. (2019, 9 de dezembro). *RELATÓRIO DO DESENVOLVIMENTO HUMANO 2019 Além do rendimento, além das médias, além do presente: As desigualdades no desenvolvimento humano no século XXI*. https://hdr.undp.org/content/human-development-report-2019?_gl=1%2Aodjzdr%2A_ga%2ANDkyMjAxMTczLjE3MDg2OTU4MjM.%2A_ga_3W7LPK0WP1%2AMTcwODY5NTgyMi4xLjAuMTcwODY5NTgzMC41Mi4wLjA.

CONLON, J. M. Reflections on a systematic nomenclature for antimicrobial peptides from the skins of frogs of the family Ranidae. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1815–1819, 2008.

CORDEIRO BAPTISTA, K. C. et al. INFECÇÕES HOSPITALARES POR *Candida* sp. EM PACIENTES INTERNADOS EM UTI. **Revista Gestão e Saúde**, v. 2, n. 22, p. 66–81, 2020.

COSTENTIN, C.; FORTAGE, J.; COLLOMB, M. N. Electrophotocatalysis: Cyclic Voltammetry as an Analytical Tool. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 11, n. 15, p. 6097–6104, 2020.

DA SILVA-JUNIO, A. G. et al. Electrochemical biosensor based on Temporin-PTA peptide for detection of microorganisms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 216, p. 114788, 15 jul. 2022a.

DA SILVA-JUNIO, A. G. et al. Electrochemical biosensor based on Temporin-PTA peptide for detection of microorganisms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 216, 15 jul. 2022b.

DA SILVA, M. M.; CARVALHO, M. S.; RIBEIRO, Y. J. Beta-Defensinas: resposta imunológica frente a microrganismos invasores e sua ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 5, p. 22818–22831, 2023.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

DEDA, D. K. et al. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 683–687, 2013.

DEENA, T.; SAMUEL, E. J. J.; ROOPAN, S. M. **Nanoparticle characterization techniques**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

DEUSENBERY, C.; WANG, Y.; SHUKLA, A. **Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. ACS Infectious Diseases**American Chemical Society, , 9 abr. 2021.

DING, J.; QIN, W. Recent advances in potentiometric biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 124, p. 115803, 2020.

DORIA, J. A. S. Produção de análogos e avaliação do potencial biotecnológico de peptídeos derivados das cupieninas. **Universidade Católica de Brasília**, p. 156, 2021.

DÖRR, T.; MOYNIHAN, P. J.; MAYER, C. Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. September, p. 4–7, 2019.

FARZAND, R. et al. A Virulence Associated Siderophore Importer Reduces Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. January, p. 1–9, 2021.

FATIMA, Tarab et al. Biosensors. In: **Electrochemical Sensors**. Woodhead Publishing, p. 1-30. 2022.

FERRAZ, A. R. F. As grandes Pandemias da História. **Revista de Ciência Elementar**, v. 8, n. 2, p. 1–16, 2020.

FERRIER, D. C.; HONEYCHURCH, K. C. Carbon nanotube (CNT)-based biosensors. **Biosensors**, v. 11, n. 12, p. 1–33, 2021.

FITZGERALD, S. et al. Multi-strain volatile profiling of pathogenic and commensal cutaneous bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

FÜRNKRANZ, U.; WALOCHNIK, J. Nosocomial infections: Do not forget the parasites! **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–21, 2021.

FUTRA, D. et al. An ultrasensitive voltammetric genosensor for the detection of bacteria *Vibrio cholerae* in vegetable and environmental water samples. **Biosensors**, v. 13, n. 6, p. 616, 2023.

GE, M. et al. Deep learning analysis on microscopic imaging in materials science. **Materials Today Nano**, v. 11, 2020.

GIL, A. C. et al. Microbiological evaluation of surfaces in intensive care: Thinking about nosocomial infection prevention strategies. **Revista Enfermagem**, v. 26, p. 1–7, 2018.

GROSSI, M.; RICCÒ, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review. **Journal of Sensors and Sensor Systems**, v. 6, n. 2, p. 303–325, 2017.

GURGEL, M. C. et al. Higienização das mãos e sua relevância para prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. e303111537103, 2022.

HABEKOST, A. Fundamentals and Applications of Electrochemical Impedance Spectroscopy - A Didactic Perspective. **World Journal of Chemical Education**, v. 9, n. 1, p. 14–21, 2021.

HASSAN, K. A.; AFTAB, A.; RIFFAT., M. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1–6, 2015.

HUAN, Y. et al. **Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Frontiers in Microbiology**Frontiers Media S.A., , 16 out. 2020.

HUANG, X.; ZHU, Y.; KIANFAR, E. Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 12, p. 1649–1672, 1 maio 2021.

INFORMATION, S.; MISHRA, B.; WANG, G. Ab Initio Design of Potent Anti-MRSA Peptides based on Database Part I : Experimental Section. **Journal of the Chemical Society**, v. 13, p. 1–13, 2012.

ISKANDAR, K. et al. Surveillance of antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: a scattered picture. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2021.

JIA, B. Y. et al. High cell selectivity and bactericidal mechanism of symmetric peptides centered on d-pro–gly pairs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.

KARBELKAR, A. A.; FURST, A. L. Electrochemical Diagnostics for Bacterial Infectious Diseases. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1567–1571, 2020.

KEMP, N. T. A Tutorial on Electrochemical Impedance Spectroscopy and Nanogap Electrodes for Biosensing Applications. **IEEE Sensors Journal**, v. 21, n. 20, p. 22232–22245, 2021.

KEMP, N. T. A Tutorial on Electrochemical Impedance Spectroscopy and Nanogap Electrodes for Biosensing Applications. **IEEE Sensors Journal**, v. 21, n. 20, p. 22232–22245, 2021.

KIM, J. E.; SHIN, J. H.; PARK, J. P. An engineered antimicrobial peptide as an alternative bioreceptor for the detection of pathogenic Escherichia coli O157:H7. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 953, n. December 2023, p. 118003, 2024.

KITAGAWA, N.; OTANI, T.; INAI, T. Nisin, a food preservative produced by *Lactococcus lactis*, affects the localization pattern of intermediate filament protein in HaCaT cells. **Anatomical Science International**, v. 94, n. 2, p. 163–171, 2019.

KOLLEF, M. H. et al. Nosocomial Infection. **Critical Care Medicine**, v. 49, n. 2, p. 169–187, 2021.

LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 7, p. 3919–3931, 2019.

LEMIECH-MIROWSKA, Ewelina et al. Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. **Annals of Agricultural and Environmental medicine**, v. 28, n. 3, 2021.

LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.

LI, Z. et al. Carbon-based functional nanomaterials: Preparation, properties and applications. **Composites Science and Technology**, v. 179, n. March, p. 10–40, 2019.

LISCANO, Y. et al. Increases in hydrophilicity and charge on the polar face of alyteserin 1c helix change its selectivity towards gram-positive bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 1–16, 2019.

LU, X. et al. Detection of mutant genes with different types of biosensor methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 126, p. 115860, 2020.

LUCENA, R. P. S. et al. Impedimetric genosensor based on graphene nanoribbons for detection and identification of oncogenic types of human papillomavirus. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1496–1503, 2021.

LUCENA, R. P. S. et al. Application of concanavalin A as a new diagnostic strategy for SARS-COV-2 spike protein. **Universidade de São Paulo**, v. 201, n. June 2023, p. 1–111, 1 jul. 2022.

LVOVICH, V. F. Impedance Analysis of Complex Systems. **Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena**, p. 113–161, 2012.

MAGALHÃES, S.; GOODFELLOW, B. J.; NUNES, A. FTIR spectroscopy in biomedical research: how to get the most out of its potential. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 56, n. 8–10, p. 869–907, 2021.

MAGAR, H. S.; HASSAN, R. Y. A.; MULCHANDANI, A. Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. **Sensors**, v. 21, n. 19, 2021.

MAJEED, Saadat et al. Electroanalytical techniques in biosciences: conductometry, coulometry, voltammetry, and electrochemical sensors. In: **Analytical Techniques in Biosciences**. Academic Press, 2022. p. 157-178.

MALVANO, F.; PILLOTON, R.; ALBANESE, D. Label-free impedimetric biosensors for the control of food safety—a review. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 468–491, 2020.

MANGONI, M. L. Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 9, p. 1060–1069, 2006.

MARIA, H.; GOMES, S. Custos de infecções hospitalares: uma revisão da literatura. **Associação Brasileira de Custos**, p. 1–16, 2021.

MEHRAD, B. et al. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. **Chest**, v. 147, n. 5, p. 1413–1421, 2015.

MESQUITA, A. S. S. et al. Infecção relacionada à assistência à saúde em Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 8, p. e13099, 2023.

MEZZETTI, Alberto; LEIBL, Winfried. Time-resolved infrared spectroscopy in the study of photosynthetic systems. **Photosynthesis Research**, v. 131, p. 121-144, 2017.

MOKOBI, F. **Atomic Force Microscope: Principle, parts, uses**. Disponível em: <<https://microbenotes.com/atomic-force-microscope-afm/>>. Acesso em: 12 mar. 2024.

MONEGRO, Alberto F.; MUPPIDI, V.; REGUNATH, H. Hospital acquired infections [Internet]. **StatPearls. StatPearls Publishing**, 2020.

MOREIRA, S. et al. CAPÍTULO 5 -MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. 2023.

MORSY, M. et al. Preparation, purification and characterization of high purity multi-wall carbon nanotube. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 132, p. 594–598, 2014.

MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

NGUEMELEU, E. T. et al. Development and validation of a time and motion guide to assess the costs of prevention and control interventions for nosocomial infections: A Delphi method among experts. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. 1–19, 2020.

NÖLLE, R. et al. A reality check and tutorial on electrochemical characterization of battery cell materials: How to choose the appropriate cell setup. **Materials Today**, v. 32, n. February, p. 131–146, 2020.

ONG, D.; ISMAIL, M. N.; SHAHRUDIN, S. Protein Composition and Biomedical Potential of the Skin Secretion of *Hylarana erythraea* (Schlegel, 1837) (Anura: Ranidae) from Langkawi Archipelago, Kedah, Peninsular Malaysia. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, n. 3, p. 2125–2133, 2021.

PAKBIN, B.; BRÜCK, W. M.; ROSSEN, J. W. A. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, 2021.

PALLARES-RUSIÑOL, Arnau et al. Advances in exosome analysis. **Advances in Clinical Chemistry; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands**, v. 112, p. 69-117, 2023.

PAN, M. et al. Electrochemical biosensors for pathogenic microorganisms detection based on recognition elements. **Folia Microbiologica**, v. 69, n. 2, p. 283–304, 2024.

REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2117–2131, 2021.

ROUSHANI, M. et al. AgNPs/QDs@GQDs nanocomposites developed as an ultrasensitive impedimetric aptasensor for ractopamine detection. **Materials Science and Engineering C**, v. 108, n. November 2019, p. 110507, 2020.

RUBINO, A.; QUEIRÓS, R. Electrochemical determination of heavy metal ions applying screen-printed electrodes based sensors. A review on water and environmental samples analysis. **Talanta Open**, v. 7, n. March, 2023.

SALEH, T. A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. **Environmental Technology and Innovation**, v. 20, p. 101067, 2020.

SANATI, A. et al. A review on recent advancements in electrochemical detection of dopamine using carbonaceous nanomaterials. **Carbon**, v. 213, 2023.

SIKORA, Anna; ZAHRA, Farah. Nosocomial infections. 2020.

SILVA JUNIOR, A. G. et al. A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavamin A peptide for bacterial detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 255, p. 3267–3274, 2018.

SINGH, R. et al. Electrical immunosensor based on dielectrophoretically-deposited carbon nanotubes for detection of influenza virus H1N1. **Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5415–5421, 2014.

SOHRABI, H. et al. Self-assembled monolayer-assisted label-free electrochemical genosensor for specific point-of-care determination of Haemophilus influenzae. **Microchimica Acta**, v. 190, n. 4, 2023.

SOUZA E SILVA, P. et al. Synthetic peptides bioinspired in temporin-PTa with antibacterial and antibiofilm activity. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 100, n. 1, p. 51–63, 1 jul. 2022.

SPIKES, Hugh A. Triboeletroquímica: Influência dos potenciais elétricos aplicados no atrito e desgaste de contatos lubrificados. **Cartas de Tribologia**, v. 68, p. 1-27, 2020.

STRONG, M. E. et al. Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 177, n. December 2020, p. 112949, 2021.

SUETENS, C. et al. Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: Results from two european point prevalence surveys, 2016 to 2017. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 46, p. 1–17, 2018.

SULEYMAN, Geehan; ALANGADEN, George J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 4, p. 1027-1053, 2021.

TAN, P.; FU, H.; MA, X. Design, optimization, and nanotechnology of antimicrobial peptides: From exploration to applications. **Nano Today**, v. 39, 2021.

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. **Akademi Farmasi Prayoga**, v. 4, n. 1, 2020.

VERLI, M. V. DE A.; GONÇALVES, L. C. DE O. Uma visão ampla das infecções hospitalares. **Biogeografia**, p. 5–24, 1967.

WANG, A. et al. A novel electrochemical enzyme biosensor for detection of 17 β -estradiol by mediated electron-transfer system. **Talanta**, v. 192, p. 478–485, 2019.

WEINER-LASTINGER, L. M. et al. The impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) on healthcare-Associated infections in 2020: A summary of data reported to the National Healthcare Safety Network. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 43, n. 1, p. 12–25, 2022.

YOON, J. et al. Highly sensitive biosensors based on biomolecules and functional nanomaterials depending on the types of nanomaterials: A perspective review. **Materials**, v. 13, n. 2, p. 1–21, 2020.

ZANNELLA, C. et al. Broad-Spectrum Antiviral Activity of the Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin L and Its Analogs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, 2022.

ZARE, Hamid R.; SHEKARI, Zahra. Types of monitoring biosensor signals. In: **Electrochemical Biosensors**. Elsevier, 2019. P. 135-166.

ZHANG, Q. Y. et al. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. **Military Medical Research**, v. 8, n. 1, p. 1–25, 2021.

ZHANG, Z.; ZHOU, J.; DU, X. Electrochemical biosensors for detection of foodborne pathogens. **Micromachines**, v. 10, n. 4, 2019.

ZILBERBEG, M. D.; KHAN, I.; SHORR, A. F. Respiratory Viruses in Nosocomial Pneumonia: An Evolving Paradigm. **Viruses**, v. 15, n. 8, p. 1–8, 2023.

APÊNDICE A – NANOSENSOR BASED ON HP-MAP1 AND CARBON NANOTUBES FOR BACTERIA DETECTION

NANOSENSOR BASED ON HP-MAP1 AND CARBON NANOTUBES FOR BACTERIA DETECTION

Winne F. S. M. Silva¹, Ludovico Migliolo², Patrícia S. Silva², Glaucia M. S. Lima³, Maria D. L. Oliveira^{1,4}, Cesar A. S. Andrade^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

²S-Inova Biotech, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, 79117-900 Campo Grande, MS, Brazil

³Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

⁴Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

C.A.S. Andrade, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: csrandrade@gmail.com

Abstract

Healthcare-associated infections pose significant challenges to global health due to pathogen complexity and antimicrobial resistance. Biosensors utilizing antimicrobial peptides offer innovative solutions. *Hylarana picturata* Multiple Active Peptide 1 (Hp-MAP1), derived from Temporin-PTA, exhibits antibacterial properties sourced from the skin secretions of the Malaysian fire-bellied frog. An innovative sensing layer was developed for the electrochemical biorecognition of diverse pathogens: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. Electrochemical impedance spectroscopy differentiated microorganisms based on distinct electrochemical responses. The sensor layer, composed of functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) associated with Hp-MAP1, exhibited varying levels of charge transfer resistance (R_{CT}) for different microorganisms. Gram-negative species, especially *P. aeruginosa*, displayed higher R_{CT} values, indicating better impedimetric responses. The biosensor platform achieved a limit of detection (LOD) of 10^1 CFU/mL and a linear detection range of 10^1 to 10^6 CFU/mL. Excellent LODs were observed for *P. aeruginosa* (0.60), *K. pneumoniae* (0.42), *E. coli* (0.67), and *S. aureus* (0.59), highlighting the efficacy of the MWCNTs/Hp-MAP1 biosensor in microbial identification. The MWCNTs/Hp-MAP1 biosensor platform presents a promising and effective microbial identification strategy, with potential healthcare applications to mitigate healthcare-associated infections and enhance patient care.

Keywords: Biosensor; antimicrobial peptide; carbon nanotubes; electrochemical impedance spectroscopy; bacteria.

Introduction

Healthcare-associated infections (HAIs) are frequently associated with ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species). The acronym ESKAPE reflects the ability of these microorganisms to escape from the action of antibiotics and hinder treatment by conventional therapies, resulting in high morbidity and mortality¹.

According to the World Health Organization (WHO) and the Global Burden of Diseases (GBD), antimicrobial resistance (AMR) is one of the main global threats to public health and population development. In 2019, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. Pneumoniae*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa* were responsible for more than 250.000 deaths associated with AMR².

According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), the highest number of pathogens reported in the ICU ward were Enterobacterales, a *Klebsiella* species, *Escherichia coli*, other Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, and Gram-positive bacteria, such as *S. aureus*, among others³.

Current bacterial identification primarily relies on conventional techniques such as bacterial culture, colony formation methods, and Gram staining. Colony-based detection is the gold standard for bacterial detection due to its accuracy and simplicity. However, they require extensive preparation time to perform the work (as it can require 24-48 hours for colonies growth), centralized laboratory facilities, trained personnel, low detection range, and skilled labor⁴.

Molecular techniques are also employed for bacterial identification due to their rapid diagnostic profile, simultaneous detection, and high sensitivity, with limits of detections (LODs) on the order of $10^1 - 10^4$ (CFU/mL); such as polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)^{4,5}. Despite these advantages, ELISA is a

disadvantaged technique in most applications due to the requirement for highly specific antibodies, antibody instability, high cost, and low yield. PCR is limited by high cost, high background signal, and laborious procedures⁶. All the factors mentioned above limit the utility of these methods, especially in environments with limited resources.

Biosensors are chemical sensors classified according to their transducer as electrochemical, optical, and mechanical. They are employed as biotechnological tools, utilizing biomolecules as recognition elements and a transducer that generates a measurable signal from their interaction. Electrochemical biosensors convert a chemical signal into an electrical signal, enabling qualitative and quantitative identification of analytes. Their adoption offers numerous benefits, including miniaturization capability, high sensitivity and specificity, rapid diagnosis, minimal sample preparation, and portability, among others⁷.

Nowadays, there is a significant increase in the development of biosensors employing antimicrobial peptides as biorecognition elements. For instance, biosensors have been developed consisting of streptavidin and oligonucleotides, with a linear detection range of $10^1 - 10^4$ CFU/mL; another type utilizes cysteine and nisin AMP, with a detection range of $1.5 - 10^1$ CFU/mL; and there is also a biosensor composed of Temporin-PTa conjugated to gold-coated magnetic nanoparticles, with a detection range of 10^1 CFU/mL^{8,9,10}.

Nanomaterials have been used to construct biosensors due to their high conductivity, biocompatible absorption, and increased surface area for contact with the analyte. Numerous biosensors were developed using nanomaterials, such as carbon nanotubes (CNTs)¹¹, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs)¹², and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)¹³ to optimize and improve their potential. MWCNTs are a type of nanomaterial used to optimize the performance of biosensors due to their excellent electrical and thermal properties, including electrical conductivity, electrocatalytic properties, increased surface area for contact, and rapid electron transfer kinetics¹⁴.

Antimicrobial peptides (AMPs) have been implemented in biosensors as biorecognition probes. AMPs are small molecules containing fewer than 50 amino acids, characterized by their amphipathic conformation and mostly by presenting an alpha-helical structure and remarkable cationic surface and antimicrobial activity¹⁰. In previous studies, biosensors based on AMPs have been well analyzed using the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) technique¹⁵.

The *Hylarana picturata* Multiple Active Peptide 1 (Hp-MAP1), with the amino acid sequence NH₂-AAGKVLKLLKKLL-COOH, is an innovative synthetic peptide derived from Temporin-PTa FFGSVLKLIPKIL-COOH. Hp-MAP1 can be synthesized using solid-phase peptide synthesis and purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Hp-MAP1 exhibited *in vitro* activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria within the 2.8 - 92 µM range, without hemolytic effect¹⁶. Temporin-PTa was used for impedimetric microorganism detection, presenting a detection limit of 10¹ CFU/mL for all pathogens tested^{10,16}.

In this study, an impedimetric biosensor based on MWCNTs and Hp-MAP1 peptide was developed. The Hp-MAP1 peptide was used as a biorecognition element for healthcare-associated infection (HAI)-causing microorganisms. The assembly procedure of the platform was characterized using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM). Diverse bacterial species were evaluated: *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *S. aureus*.

Methodology

Material

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic acid (MWCNTs), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxy succinimide (NHS), potassium ferricyanide (K₃[Fe (CN)₆]),

and potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4) and dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) were obtained from VETEC (Brazil). The peptide was purchased from the AminoTech Company (Brazil). The Hp-MAP1 peptide (NH_2 -AAGKVLKLLKKLL-COOH) was synthesized using the solid phase method employing N-9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with >95% purity in an acetonitrile/ H_2O -trifluoroacetic acid gradient solution (TFA). Other chemical reagents were of analytical grade and used without purification. Deionized water (18.2 M Ω cm) obtained from the Milli-Q plus water purification system (Millipore, Billerica, USA) was used in all experiments.

Microbial strains and culture media

K. pneumoniae strains (ATCC 700603) were cultured on nutrient agar. *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *E. coli* ATCC 25922 were cultured on Mueller-Hinton agar. Growth occurred for 24 hours at 35°C. Subsequently, two colonies were picked, washed with sterile saline solution (NaCl 0.9 g/L), centrifuged, suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7), and verified by MALDI-ToF (Bruker, Germany).

According to the McFarland scale, microbial concentrations ranging from 10^1 to 10^5 colony-forming units (CFU/mL) were obtained using a UV-vis spectrophotometer (Genesys 10 S, Thermo Scientific), with optical density at 600 nm (OD_{600}) adjusted to 0.5. The Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco (Brazil) provided all microorganisms.

Atomic force microscopy

The topographic characterization of the sensing surface occurred through atomic force microscopy (AFM) using a commercial SPM-9700 microscope (Shimadzu Corporation, Japan)

associated with Gwyddion software. The images (lateral resolution 512 x 512 pixels, scanning area 5 x 5 μm) were obtained at an ambient temperature of 25° C using cantilevers with a silicon probe (spring constant 42 Nm^{-1} and resonance frequency of 190 kHz) in the non-contact mode. All verifications were carried out in triplicate to enable reproducibility of the images obtained.

Fourier transform infrared spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed from 1000 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} with a resolution of 2 cm^{-1} . An Agilent Cary 630 FTIR spectrometer (Agilent Technologies, Rowville, Australia) with an attenuated total reflectance (ATR) accessory diamond and gold electrode sampling was used.

Electrochemical measurements

The electrochemical characterization was conducted inside a Faraday cage with an Autolab PGSTAT 302N potentiostat/galvanostat (Ecochemie, Netherlands) interfaced by the NOVA 1.11 software. The experiments used three electrodes: a gold disc electrode ($\phi = 2\text{mm}$) as the working electrode, platinum wire as an auxiliary electrode, and Ag/AgCl (3 M KCl) as a reference electrode. Impedance spectra were obtained from 100 mHz to 100 kHz with a sine wave potential amplitude of 10 mV. The solution content 20 mL of 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (1:1, v:v) was prepared in 10 mM PBS (pH 7.4) and used as a redox probe. All measurements were performed in triplicates at $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Modified electrode preparation

MWCNTs functionalized with carboxylic acid (0.5 mg/mL) were dispersed in 10 mL of 0.1 M H_2SO_4 . The solution was stirred in an ultrasonic bath for 30 min to obtain a

homogeneous black suspension. Subsequently, the working electrode was immersed in the CTAB/MWCNTs solution, and electrodeposition was used in the potential range of - 0.8 V to + 1.2V (10 cycles, scan rate = 100 mV.s⁻¹) to obtain a film of MWCNTs on the electrode surface^{17,18}.

MWCNTs/Hp-MAP-1 sensor assembly

Before each experiment, the bare gold electrode surface (BGE) was polished using 0.3 µm alumina slurry and immersed in deionized water. The carboxylic groups of MWCNTs were activated using EDC:NHS coupling agents (4:1 M, v:v). Subsequently, 2 µL of Hp-MAP1 (0.7 mM) was added. The time until complete adsorption was 30 min. After each step, the electrode was carefully washed with deionized water to remove unbound molecules.

A schematic representation of the step-by-step assembly of the biosensor is shown in Fig. 1. The analytical characteristics of the MWCNTs/Hp-MAP1 sensor platform were evaluated from electrochemical assays using microorganisms diluted in PBS (10 mM, pH 7) in increasing concentrations (10¹-10⁶ CFU/mL) with an incubation time of 5 min.

Biorecognition analysis

The sensor platform was incubated for 5 min at room temperature in freshly prepared microbial suspensions at different concentrations (10¹-10⁵ CFU/mL). Deionized water was used to remove unbound molecules, and then the biosensor was subjected to electrochemical analysis. The biosensor was tested against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *S. aureus*.

Results and Discussion

Topographic characterization

The AFM technique was used to characterize the assembly steps of the sensor platform and its interaction with the tested microorganisms (Fig. 2). Root mean square roughness (Rms) and mean roughness (Ra) parameters were used to evaluate the roughness of the samples. Fig. 2a shows a topographic image of the electrodeposited MWCNTs film. The MWCNTs film was distributed on the electrode surface, presenting peaks with a maximum height of 210 nm (Rms = 19.33 nm, Ra = 12.58 nm).

After Hp-MAP1 adsorption, the roughness of the topographic profile changed significantly (Fig. 2b). The MWCNTs film presented Rms = 21.54 nm and Ra = 15.63 nm. A uniform arrangement was obtained on the electrode surface coated with MWCNTs after the Hp-MAP1 interaction. Fig. 2c shows the morphological variation of the biosensor surface after its exposure to the Gram-positive bacteria sample, resulting in a homogeneous morphology with isolated regions with a maximum height of 340 nm (Rms = 31.29 nm, Ra = 23.41 nm).

The biosensor was exposed to Gram-negative bacteria (Fig. 2d). Measurements revealed well-defined peaks and valleys with a maximum height of 423 nm (Rms = 42.10 nm, Ra = 35.67). The differences observed in the AFM analysis may be attributed to Hp-MAP1 (+4 charge) capacity to electrostatically interact with negatively charged molecules and lipopolysaccharides (LPS) present in the cellular membrane of each bacterial type. Thus, this demonstrates a stronger affinity to Gram-negative bacteria due to its membrane-negative charge¹⁹.

FTIR analysis

The measurements were carried out in the 4000 – 1000 cm⁻¹ spectrum region to evaluate the functional groups. Fig. S1 shows the FTIR-ATR spectra of the functionalized MWCNTs.

The FTIR spectrum displays the absorption bands of 3000-3500 cm^{-1} attributable to the stretching vibration of the OH bond. The absorption peak of 2920-2851 cm^{-1} resulted from the stretching vibration of two carbonyl groups. The peak at 1470 cm^{-1} is attributed to the stretching of the C=O group. The strong peaks from 963-911 cm^{-1} are attributed to a C-O-C stretching, probably due to the presence of surfactant²⁰.

SEM analysis

Figs. S2a-b show that MWCNTs spread uniformly in the wire-shaped nanostructure. Previous studies have also demonstrated similar findings^{21, 22}. MWCNTs were analyzed to evaluate their size and structure. The samples were examined at two different magnifications (50,000 and 100,000) to generate images of the samples. MWCNTs exhibited an average diameter of approximately 80.26 nm.

Electrochemical characterization

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ was used as a redox couple to evaluate the electrochemical reactions at an electrode/electrolyte interface. Fig. S3a shows the formation of the MWCNTs film carried out by the electrodeposition process. Nyquist impedance spectra were recorded after impedimetric measurements to evaluate the sensor assembly steps (Fig. 3).

Impedimetric responses were fitted according to the modified Randles equivalent circuit (inset of Fig. S3b). The Randles circuit consists of the resistance of the electrolyte solution (R_s) and a Warburg impedance (Z_w), representing the volume and diffusion properties of the redox couple. In contrast, the charge transfer resistance (R_{CT}) and constant phase element (CPE) reflect the dielectric and insulating characteristics of the sensor/electrolyte interface²³.

R_{CT} values are widely explored in electrochemical biosensors due to their relationship with variations in the diameter of the semicircle when physical, chemical, or biological

interactions occur on the electrode surface. Of note, the analytical responses and the respective R_{CT} values are directly proportional to the concentration of the analyte recognition²⁴.

The impedance spectra of the biosensor after exposure to different microorganisms at different concentrations were evaluated based on the following equation²⁵:

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT}(\text{microorg}) - R_{CT}(\text{biosensor})}{R_{CT}(\text{biosensor})} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

where $R_{CT}(\text{biosensor})$ corresponds to the electron transfer resistance value of the biosensor, $R_{CT}(\text{microorg})$ is the electron charge transfer resistance value of the MWCNTs/Hp-MAP1 modified electrode after being exposed to solutions containing microorganisms in different concentrations.

Impedimetric analysis

The BGE showed an initial semicircle ($R_{CT} = 0.092 \text{ k}\Omega \pm 0.010 \text{ k}\Omega$) increasing after the electrodeposition of MWCNTs ($R_{CT} = 0.742 \text{ k}\Omega \pm 0.042 \text{ k}\Omega$), indicating the formation of the film under the surface resulting in a coverage of the electrode (Fig. S3b). An increase in the R_{CT} ($1.940 \text{ k}\Omega \pm 0.015 \text{ k}\Omega$) was observed after the Hp-MAP1 immobilization (Fig. S3b), indicating the binding of the peptide on the modified electrode surface.

Previous studies have demonstrated the ability of AMPs as biorecognition probes in biosensors (Table 2). Fig. 3 shows the biosensor's impedimetric responses after interactions with the studied bacteria, following the sequence: *P. aeruginosa* > *K. pneumoniae* > *E. coli* > *S. aureus*. Table 3 shows the fitted impedance data extracted from the modified Randles equivalent circuit.

The values obtained for the degree of surface coverage (θ) were evaluated after the sensor interacted with the target microorganisms. The values of θ were obtained from equation 2²⁵.

$$\theta (\%) = 1 - \frac{R_{CT}(\text{biosensor})}{R_{CT}(\text{microorg})} \quad \text{Eq. 2}$$

Results of θ and ΔR_{CT} to evaluate the specific response of the biosensor are demonstrated in Fig. 4, where R_{CT} (biosensor) is the electron transfer resistance of the biorecognition sensing layer MWCNTs/Hp-MAP1 and R_{CT} (microorg) is the R_{CT} values after exposure to microorganisms. ΔR_{CT} and θ demonstrate the filling of the sensor layer by different concentrations of microorganisms, revealing unique electrochemical responses based on the peptide and microorganism interaction²⁵. Fig. S4 demonstrates the variation of ΔR_{CT} for each isolated microorganism and the value of R^2 .

We obtained a low LOD that corroborates with the LODs reported in clinical situations such as bacteremia and bacteriuria in ICU patients, which present blood and urine concentrations of 15 CFU/mL and $10^1 - 10^4$ CFU/mL, respectively^{10,26,27}. Da Silva et al. (2022) reported on a biosensor composed of AMP T-PTa with a LOD = 10^1 CFU/mL. In this work, the sensor showed a LOD of 10^1 CFU/mL for all pathogens. We obtained a significant LOD of 0.60 CFU/mL for *P. aeruginosa*, 0.42 CFU/mL for *K. pneumoniae*, 0.67 CFU/mL for *E. coli*, and 0.59 CFU/mL for *S. aureus*.

Hp-MAP1 was used as a biorecognition probe to detect distinct microbial species. Electrical charges and hydrophobicity are crucial in AMP's interactions with microorganisms. In the specific Hp-MAP1 context, these properties are essential in promoting the initial electrostatic interaction between the peptide and the bacterial cell membrane. The relevance of these molecular and structural characteristics gives AMPs, such as Hp-MAP1, an instrumental potential in microorganism diagnosis²⁸.

Gram-negative bacteria have lipopolysaccharides (LPS) in abundance in the composition of their outer membrane. The resulting negative charge facilitates the biorecognition^{29,30}. This fact is proven by the impedance spectra (Fig. 3a-d), corroborating the values extracted from the modified Randles equivalent circuit shown in Table 1.

On the other hand, Gram-positive bacteria are characterized by a thick layer of peptidoglycan with a more positive surface than Gram-negative bacteria. Thus, the positive surface shields the interaction with Hp-MAP1 to recognize the bacterial wall. However, Hp-MAP1 demonstrated the ability to recognize Gram-positive bacteria¹⁶.

The differences between the equivalent circuit components were related to the CPE and the R_{CT} . CPE is related to the thickness of the double dielectric layer at the interface. At the same time, the R_{CT} is associated with the charge transfer resistance after the AMP-target interaction, modifying the kinetics of the redox reaction. These electrochemical parameters were useful for discriminating the studied bacteria³¹.

Changes in the semicircle diameter suggest bacteria detection through the AMP-modified sensor surface. The difference in the R_{CT} values is proportional to the number of microbial cells present in the dilutions tested. CPE values decrease due to reduced free sites on the electrode surface area³². The biorecognition of microorganisms by AMPs comes from the attractive forces between their charges; the electrostatic interaction is followed by the insertion and permeabilization of the bacterial cell wall^{33,34}. Hp-MAP1 (NH₂-AAGKVLKLLKKLL-COOH) has a +4 charge, making it more prone to recognition by gram-negative bacteria and presenting an α -helical conformation, improving electrostatic interaction. This interaction mechanism explains the biorecognition process observed in the proposed biosensor when tested against different microorganisms³⁵.

Conclusion

We developed a nanostructured biosensor based on AMP Hp-MAP1 for detecting pathogenic microorganisms. Topographic analysis demonstrated effective immobilization of the Hp-MAP1 peptide on the biosensor surface. Impedimetric results demonstrated that Hp-MAP1 can detect microbial species based on R_{CT} variation. The electrochemical evaluation

revealed excellent LODs of 0.60 (CFU/mL), 0.42 (CFU/mL), 0.67 (CFU/mL), and 0.59 (CFU/mL) respectively for *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* and *S. aureus* and a linear detection range (10^1 - 10^6 CFU/mL). In addition, the significant variation in the R_{CT} of the system and other components of the equivalent circuit indicated the biosensor's ability to recognize and differentiate the microorganisms tested. Furthermore, the sensor system revealed significant electrochemical responses to Gram-negative bacteria, especially *P. aeruginosa*. MWCNTs/Hp-MAP1-based biosensor contribute to expanding the use of AMPs as biorecognition elements, potentially offering a precise and efficient alternative for diagnosing HAIs.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant number 304678/2021-0 and 304680/2021-4). Silva WFSM would like to thank FACEPE for the MSc scholarship.

References

1. Ma Y, Wang C, Li Y et al. Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Adv Sci.* 2019;7(1):1901872. doi:10.1002/advs.201901872.
2. MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, p. 629-655, Feb. 2022. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0). Accessed on: 14 Feb. 2024.
3. Diseases and Organisms in Healthcare Settings | HAI | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 7 de outubro de 2019. Acedido em 2 de março de 2024. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html>
4. CASTLE, Lauren M. et al. Electrochemical Sensors to Detect Bacterial Foodborne Pathogens. *ACS Sensors*, vol. 6, no. 5, p. 1717-1730, May 6, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsenors.1c00481>. Accessed on: 14 Feb. 2024.

5. Deussenbery C, Wang Y, Shukla A. Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. *ACS Infect Dis.* 2021;7(4):695-720. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00890.
6. Sharma A, Sharma N, Kumari A, Lee HJ, Kim T, Tripathi KM. Nano-carbon based sensors for bacterial detection and discrimination in clinical diagnosis: A junction between material science and biology. *Appl Mater Today.* 2020;18:100467. doi:10.1016/j.apmt.2019.100467.
7. Chadha U, Bhardwaj P, Agarwal R et al. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *J Ind Eng Chem.* 2022;109:21-51. doi:10.1016/j.jiec.2022.02.010.
8. LI, Yan et al. A sensitive electrochemical strategy via multiple amplification reactions for the detection of *E. coli* O157: H7. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 147, p. 111752, Jan. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111752>. Accessed on: 14 Feb. 2024.
9. MALVANO, Francesca; PILLOTON, Roberto; ALBANESE, Donatella. A novel impedimetric biosensor based on the antimicrobial activity of the peptide nisin for the detection of *Salmonella* spp. *Food Chemistry*, vol. 325, p. 126868, Sep. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126868>. Accessed on: 14 Feb. 2024.
10. da Silva AG, Frias IA, Lima-Neto RG et al. ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON TEMPORIN-PTA PEPTIDE FOR DETECTION OF MICROORGANISMS. *J Pharm Biomed Anal.* 2022;114788. doi:10.1016/j.jpba.2022.114788.
11. APPATURI, Jimmy Nelson et al. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* with reduced graphene oxide-carbon nanotube based electrochemical aptasensor. *Analytical Biochemistry*, vol. 589, p. 113489, Jan. 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113489>. Accessed on: 14 Feb. 2024.
12. LEE, Bog Eum et al. A single-walled carbon nanotubes-based electrochemical impedance immunosensor for on-site detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*, vol. 87, no. 1, p. 280-288, 21 Dec. 2021. Available at: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15996>. Accessed on: 14 Feb. 2024.

13. Bekmezci SA, Soylemez S, Yilmaz G, Udum YA, Yagci Y, Toppare L. A new ethanol biosensor based on polyfluorene-g-poly(ethylene glycol) and multiwalled carbon nanotubes. *Eur Polym J*. 2020;122:109300. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.109300.

14. Yoon J, Shin M, Lee T, Choi JW. Highly Sensitive Biosensors Based on Biomolecules and Functional Nanomaterials Depending on the Types of Nanomaterials: A Perspective Review. *Materials*. 2020;13(2):299. doi:10.3390/ma13020299.

15. Seyfi R, Kahaki FA, Ebrahimi T et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. *Int J Pept Res Ther*. 2019;26(3):1451-1463. doi:10.1007/s10989-019-09946-9.

16. Souza e Silva P, Ferreira MA, de Moraes LF et al. Synthetic peptides bioinspired in temporin-PTa with antibacterial and antibiofilm activity. *Chem Biol Amp Drug Des*. 2022. doi:10.1111/cbdd.14052.

17. Arunkumar T, Karthikeyan R, Ram Subramani R, Viswanathan K, Anish M. Synthesis and characterization of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). *Int J Ambient Energy*. 2018;41(4):452-456. doi:10.1080/01430750.2018.1472657.

18. Bolat G, Yaman YT, Abaci S. Highly sensitive electrochemical assay for Bisphenol A detection based on poly (CTAB)/MWCNTs modified pencil graphite electrodes. *Sens Actuators B*. 2018;255:140-148. doi:10.1016/j.snb.2017.08.001.

19. Islam MA, Karim A, Ethiraj B, Raihain T, Kadier A. Antimicrobial peptides: Promising alternatives over conventional capture ligands for biosensor-based detection of pathogenic bacteria. *Biotechnol Adv*. 2022-55-107901. doi: 10.1016/j.biotechady.2021.107901.

20. TUCUREANU, Vasilica et al. Preparation and evaluation of nanocomposites based on transitional oxides and carbon materials for electrochemical applications. *Ceramics International*, jun. 2022. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.06.032>. Accessed on: 15 Feb. 2024.

21. Anshori I, Nuraviana Rizalputri L, Rona Althof R et al. Functionalized multi-walled carbon nanotube/silver nanoparticle (f-MWCNT/AgNP) nanocomposites as non-enzymatic electrochemical biosensors for dopamine detection. *Nanocomposites*. 2021;7(1):97-108. doi:10.1080/20550324.2021.1948242.

22. MORSY, Mohamed et al. Preparation, purification, and characterization of high purity multi-wall carbon nanotube. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 132, p. 594-598, nov. 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.122>. Accessed on: 15 Feb. 2024.

23. Leva-Bueno J, Peyman SA, Millner PA. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(3):343-362. doi:10.1007/s00430-020-00668-0.

24. Bertok T, Lorencova L, Chocholova E et al. Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Biosensors: Mechanistic Principles, Analytical Examples and Challenges towards Commercialization for Assays of Protein Cancer Biomarkers. *ChemElectroChem*. 2018;6(4):989-1003. doi:10.1002/celc.201800848.

25. Lucena RP, Silva-Junior AG, Gil LH, Cordeiro MT, Andrade CA, Oliveira MD. APPLICATION OF CONCAVALIN A AS A NEW DIAGNOSTIC STRATEGY FOR SARS-COV-2 SPIKE PROTEIN. *Biochem Eng J* 2023;109116. doi:10.1016/j.bej.2023.109116.

26. Jiang K, Etayash H, Azmi S et al. Rapid label-free detection of E. coli using antimicrobial peptide assisted impedance spectroscopy. *Anal Methods*. 2015;7(23):9744-9748. doi:10.1039/c5ay01917f.

27. Etayash H, Jiang K, Thundat T, Kaur K. Impedimetric Detection of Pathogenic Gram-Positive Bacteria Using an Antimicrobial Peptide from Class IIa Bacteriocins. *AnalChem*. 2014;86(3):1693-1700. doi:10.1021/ac4034938.

28. Lima PG, Oliveira JT, Amaral JL, Freitas CD, Souza PF. Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sci*. 2021;278:119647. doi:10.1016/j.lfs.2021.119647.

29. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002;66(4):236-248. doi:10.1002/bip.10260.

30. Bin Hafeez A, Jiang X, Bergen PJ, Zhu Y. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci* 2021;22(21):11691. doi:10.3390/ijms222111691.

31. Córdoba-Torres P, Mesquita TJ, Nogueira RP. Relationship between the Origin of Constant-Phase Element Behavior in Electrochemical Impedance Spectroscopy and Electrode Surface Structure. *J Phys Chem C*. 2015;119(8):4136-4147. doi:10.1021/jp512063f.

32. Saxena R, Srivastava S. An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit. *Sens Actuators B*. 2019;297:126780. doi:10.1016/j.snb.2019.126780.

33. Levin A, Hakala TA, Schnaider L, Bernardes GJ, Gazit E, Knowles TP. Biomimetic peptide self-assembly for functional materials. *Nat Rev Chem*. 2020;4(11):615-634. doi:10.1038/s41570-020-0215-y.

34. Tzong-Hsien L, Hall Kristopher N, Marie-Isabel A. Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus. *Ingenta Connect*. Home: Ingenta Connect. January 1, 2016. Accessed January 26, 2024. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ctmc/2016/00000016/00000001/art00006>.

35. Kim JE, Shin JH, Park JP. An engineered antimicrobial peptide as an alternative bioreceptor for the detection of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7. *J Electroanal Chem*. 2024;953:118003. doi:10.1016/j.jelechem.2023.118003.

36. A.G. Silva Junior, M.D.L. Oliveira, I.S. Oliveira, R.G. Lima-Neto, S.R. S´a, O. L. Franco, C.A.S. Andrade, A simple nanostructured impedimetric biosensor based on clavanin a peptide for bacterial detection, *Sens. Actuators, B Chem*. 255 (2018) 3267–3274, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.153>.

37. KIM, Jung Eun; SHIN, Jae Hwan; PARK, Jong Pil. An engineered antimicrobial peptide as an alternative bioreceptor for the detection of pathogenic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, p. 118003, 2023.

Table captions

Table 1. Data of the equivalent circuit elements from fitted impedance results for bacteria recognition.

Modified Electrode	CFU/mL	RCT (k Ω)	CPE (μ F)	RS (k Ω)	W
HP-MAP1 platform	-	1.940 $\pm$ 0.015	6.37 $\pm$ 0.010	219 $\pm$ 0.017	1.24 $\pm$ 0.0139
<i>P. aeruginosa</i>	10 ¹	2.780 $\pm$ 0.021	4.28 $\pm$ 0.060	0.243 $\pm$ 0.056	598 $\pm$ 0.213
	10 ²	2.950 $\pm$ 0.098	3.28 $\pm$ 0.109	0.252 $\pm$ 0.070	536 $\pm$ 0.281
	10 ³	3.320 $\pm$ 0.183	2.85 $\pm$ 0.067	0.255 $\pm$ 0.056	541 $\pm$ 0.308
	10 ⁴	3.750 $\pm$ 0.120	2.77 $\pm$ 0.068	0.245 $\pm$ 0.098	773.5 $\pm$ 0.314
	10 ⁵	3.810 $\pm$ 0.084	2.04 $\pm$ 0.028	0.250 $\pm$ 0.021	661 $\pm$ 0.169
	10 ⁶	3.820 $\pm$ 0.098	1.71 $\pm$ 0.013	0.233 $\pm$ 0.100	977 $\pm$ 0.115
<i>K. pneumoniae</i>	10 ¹	2.270 $\pm$ 0.070	4.77 $\pm$ 0.036	0.266 $\pm$ 0.019	913 $\pm$ 0.0613
	10 ²	2.710 $\pm$ 0.014	3.61 $\pm$ 0.038	0.278 $\pm$ 0.024	879 $\pm$ 0.0300
	10 ³	2.790 $\pm$ 0.049	3.30 $\pm$ 0.017	0.273 $\pm$ 0.035	884 $\pm$ 0.0321
	10 ⁴	3.020 $\pm$ 0.070	2.74 $\pm$ 0.014	0.270 $\pm$ 0.010	897 $\pm$ 0.0304
	10 ⁵	3.320 $\pm$ 0.042	2.38 $\pm$ 0.015	0.271 $\pm$ 0.025	923 $\pm$ 0.0247
	10 ⁶	3.570 $\pm$ 0.0120	2.10 $\pm$ 0.012	0.278 $\pm$ 0.010	926 $\pm$ 0.0307
<i>E. coli</i>	10 ¹	2.320 $\pm$ 0.021	3.80 $\pm$ 0.011	0.218 $\pm$ 0.077	1.21 $\pm$ 0.0436
	10 ²	2.430 $\pm$ 0.042	3.32 $\pm$ 0.010	0.234 $\pm$ 0.014	1.16 $\pm$ 0.0446
	10 ³	2.650 $\pm$ 0.070	2.89 $\pm$ 0.077	0.221 $\pm$ 0.042	1.20 $\pm$ 0.0264
	10 ⁴	2.750 $\pm$ 0.042	2.67 $\pm$ 0.035	0.221 $\pm$ 0.049	1.18 $\pm$ 0.0236
	10 ⁵	2.960 $\pm$ 0.084	2.39 $\pm$ 0.014	0.225 $\pm$ 0.021	1.18 $\pm$ 0.0286
	10 ⁶	3.170 $\pm$ 0.021	2.26 $\pm$ 0.012	0.219 $\pm$ 0.014	1.20 $\pm$ 0.0133
<i>S. aureus</i>	10 ¹	2.130 $\pm$ 0.049	2.91 $\pm$ 0.067	0.227 $\pm$ 0.035	946 $\pm$ 0.0408
	10 ²	2.230 $\pm$ 0.077	2.33 $\pm$ 0.027	0.220 $\pm$ 0.012	984 $\pm$ 0.0241
	10 ³	2.420 $\pm$ 0.070	2.08 $\pm$ 0.011	0.220 $\pm$ 0.070	948 $\pm$ 0.0669

10^4	$2.640 \pm$ 0.035	$1.90 \pm$ 0.008	$0.221 \pm$ 0.002	$962 \pm$ 0.0679
10^5	$2.770 \pm$ 0.021	1.77 ± 0.0 07	$0.223 \pm$ 0.021	$943 \pm$ 0.0666
10^6	$2.990 \pm$ 0.056	$1.73 \pm$ 0.003	$0.220 \pm$ 0.001	$960 \pm$ 0.013

Table 2. Analytical performance of AMP-based biosensors for microbial detection.

Recognition element	Sensor Platform	Transducer	LOD CFU/mL	Microbial target	Referen ce
AMP (Nisin)	Cys	CV, EIS and SFI	1.5 CFU/mL	<i>L. innocua</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. nottingham</i> , <i>S. rissen</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i>	[9]
AMP (Temporin- PTA)	Fe ₃ O ₄ @Au on Gold surface- MBA	CV and EIS	10 ¹ CFU/mL	<i>K. pneumoniae</i> A. <i>baumannii</i> B. <i>subtilis</i> E. <i>faecalis</i> C. <i>albicans</i> C. <i>tropicalis</i>	[10]
AMP (Clavanin A)	AuNPs	CV and EIS	10 ¹ CFU/mL	<i>S. typhimurium</i> B. <i>subtilis</i> E. <i>coli</i> K. <i>pneumoniae</i>	[36]
AMPs (Magainina 1 and Clavanin A)	Au/TA- PEI/AMP	CV and DPV	3.4 CFU/mL	<i>E. coli</i> , <i>S. succinus</i> , V. <i>parahaemolyticus</i> , <i>L. monocytogenes</i>	[37]
AMP (HP-MAP1)	MWCNTs	EIS	10 ¹ CFU/mL	<i>P. aeruginosa</i> , K. <i>pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S.</i> <i>aureus</i>	This work

Figure captions

Figure 1. Schematic illustration of the MWCNTs/HP-MAP1 modified electrode.

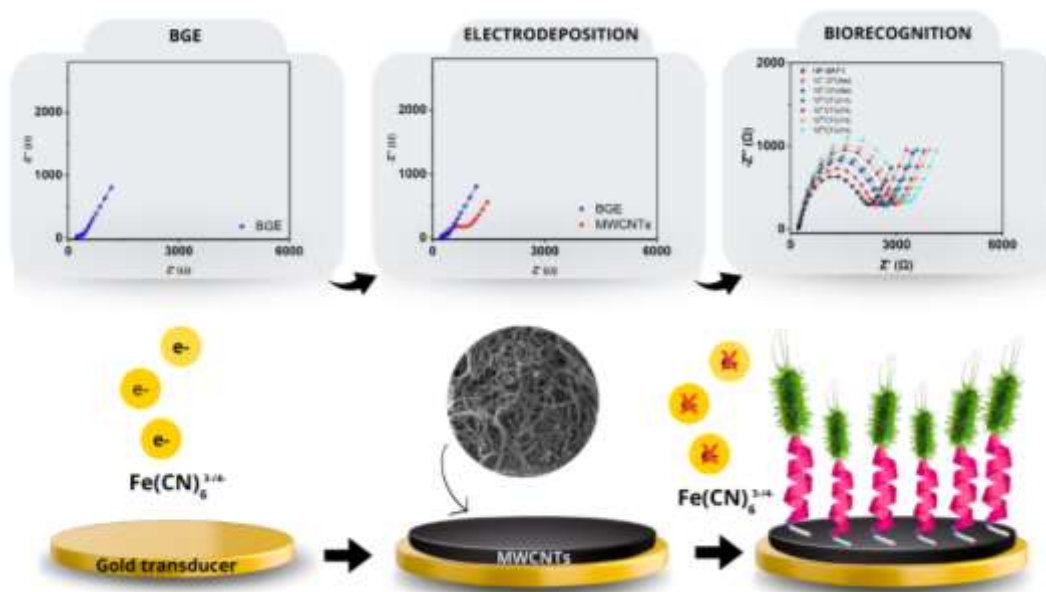


Figure 2. 3D AFM images of the electrode modification process and bacteria recognition: MWCNTs (a), HP-MAP1 (b), Gram-positive bacteria (c), and Gram-negative bacteria (d).

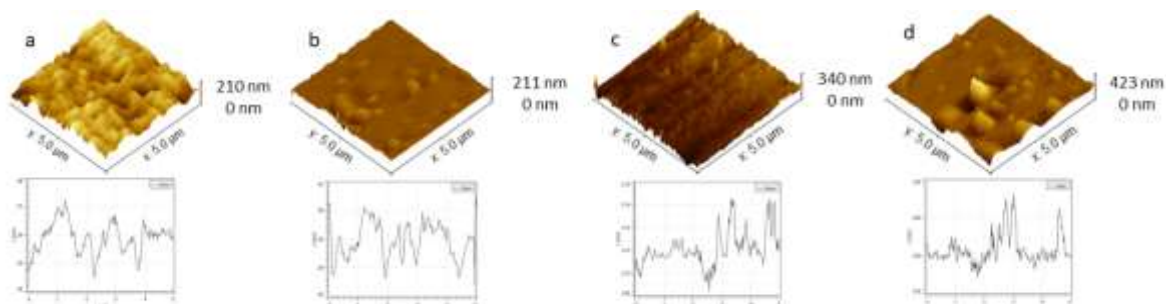


Figure 3. Nyquist plots of the HP-MAP1 biosensor for different concentrations (CFU/mL) of *P. aeruginosa* (a), *K. pneumoniae* (b), *E. coli* (c) and *S. aureus* (d).

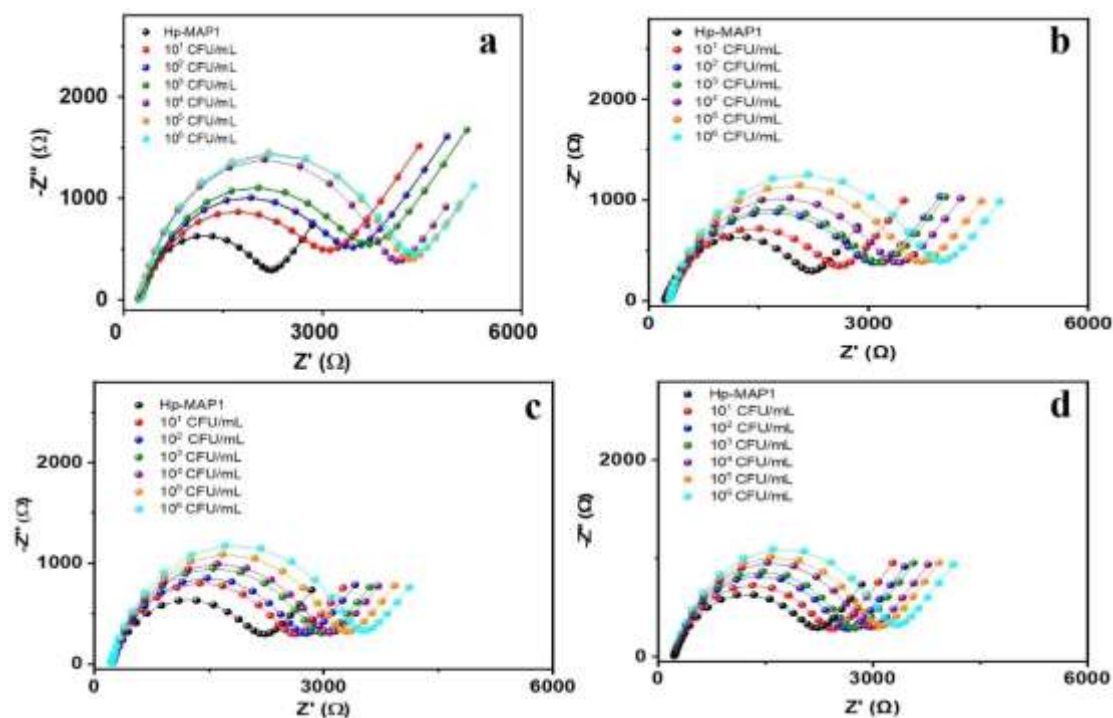


Figure 4. Degree of electrode surface coverage with HP-MAP1 (a), and ΔR_{CT} plot (b) for the study of selectivity with different microorganisms.

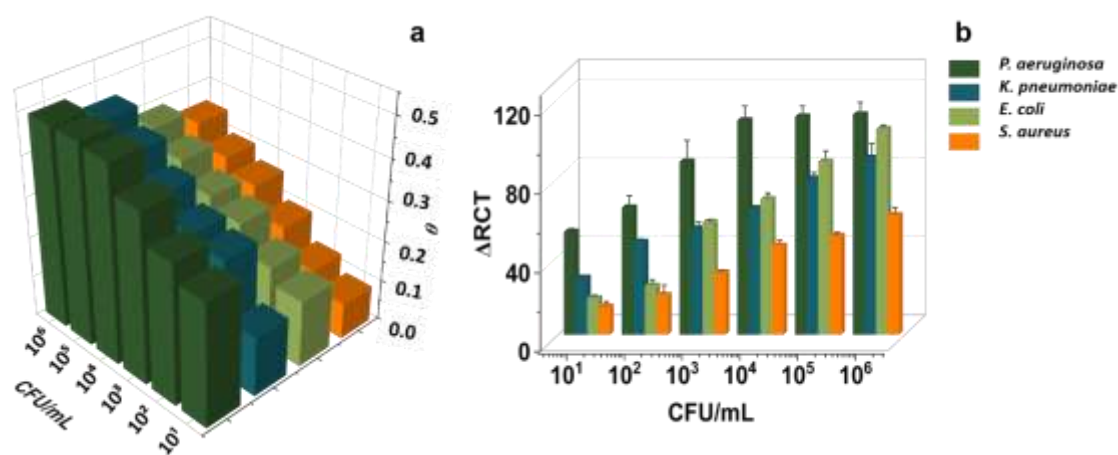


Figure S1. FTIR-ATR of gold electrode before electrodeposition.

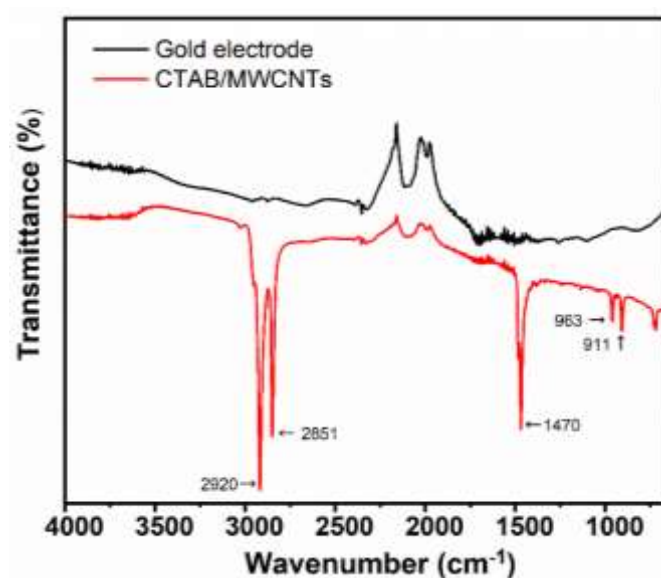


Figure S2. SEM Image of MWCNTs Cluster at 50.0 Kx Magnification (a), 100 Kx Magnification (b).

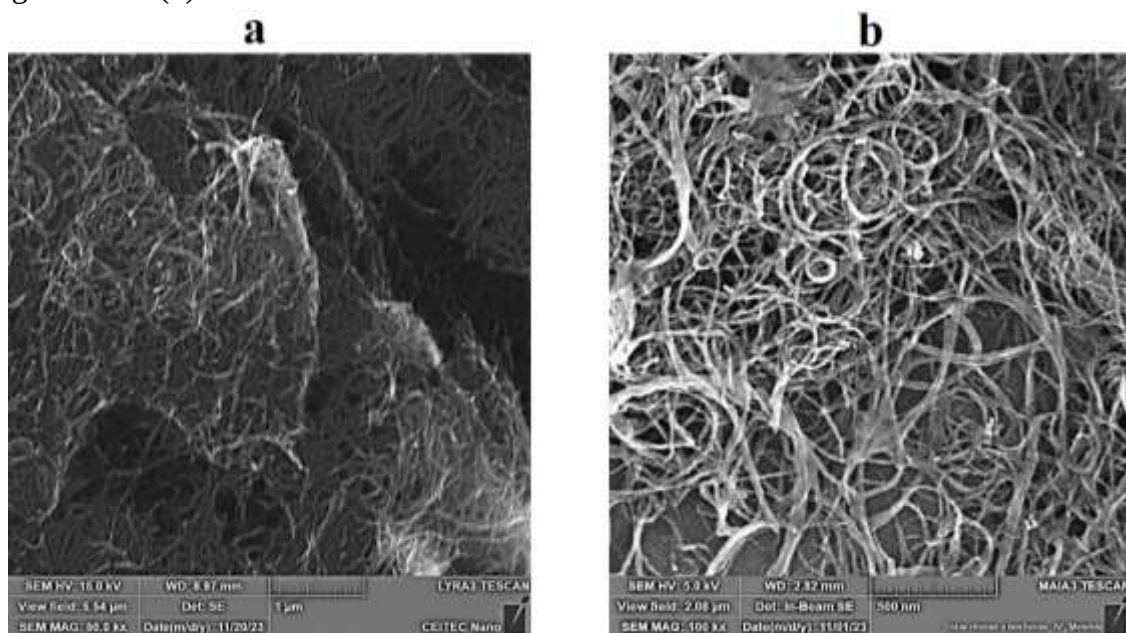


Figure S3. Cyclic voltammograms of a) electrodeposition of MWCNTs on work electrode. Potential scanned from - 0.8 V to + 1.2vs Ag/AgCl RE. Ten cycles performed at a scan rate of 100 mV.s^{-1} and b) Nyquist diagram in $10 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ containing PBS (10 mM ; $\text{pH } 7$) of bare gold electrode (blue) after electrodeposition of MWCNTs (red).

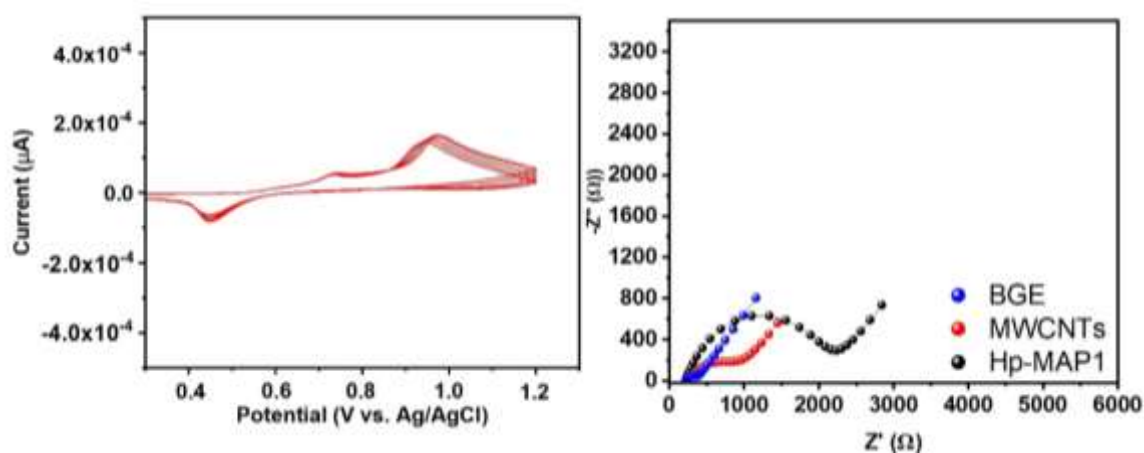


Figure S4. Variation of ΔRCT for each isolated microorganism and the value of R^2 .

