



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

DRYELLI FRANCES SANTANA DA SILVA

**BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E PEPTÍDEO  
TEMPHYLARATA PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO**

RECIFE  
2024

DRYELLI FRANCES SANTANA DA SILVA

**BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E PEPTÍDEO  
TEMPHYLARATA PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO**

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

Orientador: César Augusto Souza de Andrade  
Coorientador: Alberto Galdino da Silva Junior

RECIFE  
2024

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

Silva, Dryelli Frances Santana da.  
BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS E PEPTÍDEO TEMPHYLARATA PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO / Dryelli Frances Santana da Silva. -  
Recife, 2024.

75

Orientador(a): César Augusto Souza de Andrade  
Coorientador(a): Alberto Galdino da Silva Junior  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Nanossensor. 2. Nanomaterial . 3. Biotecnologia. 4. Inovação terapêutica.  
I. Andrade, César Augusto Souza de . (Orientação). II. Silva Junior, Alberto  
Galdino da . (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

DRYELLI FRANCES SANTANA DA SILVA

**BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E PEPTÍDEO  
TEMPHYLARATA PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO**

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

Aprovada em: 10/10/2024

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Coorientador: Prof. Dr. Alberto Galdino da Silva Junior  
Universidade Federal de Pernambuco/  
Dep. De Bioquímica

---

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

---

Prof. Ms. Karen Loraine Macena  
Santos Universidade Federal de Pernambuco /  
Dep. de Bioquímica

Dedico este trabalho ao meu primo,  
Daniel Félix (2007-2024). Amado filho e  
irmão, jogador de futebol, empinador de  
pipas.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, César Andrade e aos meus coorientadores, Alberto Júnior e Maria Danielly. Gostaria de agradecer também ao Departamento de Bioquímica onde se localiza o BioNano, laboratório onde produzi esta pesquisa fomentada pelo CNPQ. Também devo agradecimentos aos meus colegas de laboratório, Brenda e Caíque, que me ajudaram na elaboração deste trabalho. Aos amigos que fiz durante a caminhada acadêmica: Ranielli, Diego, Mauricio e Zion que me apoiaram e me fizeram rir durante os momentos ruins e aos amigos de longa data: Mateus Pessoa, Thiago e Ícaro agradeço toda paciência. Agradeço a Cristo e a Virgem Santíssima pela oportunidade de cuidar do próximo em minha profissão. Gratifico aos meus pais, Fabiana e Davi, por todo sacrifício durante a graduação e a minhas irmãs, Flavia e Danieli, por suportarem meu humor durante as provas.

*Crux Sancti Patris Benedicti!  
Crux Sacra Sit Mihi Lux  
Non Draco Sit Mihi Dux  
Vade Retro Satana  
Nunquam Suade Mihi Vana  
Sunt Mala Quae Libas  
Ipse Venena Bibas*

*- São Bento*

Silva, Dryelli Frances Santana da. BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO BASEADO EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E PEPTÍDEO TEMPHYLARATA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO. 2024. 76 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## RESUMO

As infecções associadas aos cuidados de saúde (IRAS) são uma grande preocupação global, levando ao aumento da morbidade, mortalidade e custos de saúde. A detecção precisa e oportuna de patógenos microbianos é fundamental para o manejo e prevenção dessas infecções. Os métodos convencionais de detecção microbiana, como técnicas de cultura, reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunoenaios, embora amplamente utilizados, apresentam desvantagens significativas. Estes incluem longos tempos de processamento, custos elevados e a necessidade de equipamento especializado e pessoal qualificado. Biossensores eletroquímicos surgiram como uma abordagem promissora e inovadora para detecção bacteriana rápida e sensível. Ao converter interações biológicas em sinais elétricos mensuráveis, esses biossensores oferecem detecção em tempo real com alta sensibilidade e especificidade. Nanopartículas como as magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) desempenham um papel crucial no aprimoramento de plataformas eletroquímicas, oferecendo alta condutividade, área superficial e propriedades magnéticas. As nanopartículas de ouro juntamente com a quitosana formam o núcleo-casca que adiciona à plataforma sensora a propriedade de estabilidade. Esses recursos melhoram a sensibilidade, permitindo uma detecção mais rápida e precisa em aplicações de biossensor. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) estão emergindo como biorreceptores promissores em plataformas de biossensores eletroquímicos devido à sua capacidade de se ligar e romper seletivamente as membranas microbianas. Sua atividade de amplo espectro, estabilidade e facilidade de funcionalização tornam os AMPs ideais para aumentar a sensibilidade e a especificidade da detecção bacteriana. O presente trabalho propôs o desenvolvimento de uma plataforma biossensora baseada em monocamadas automontadas de cisteína,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcionalizadas com quitosana (núcleo-casca) e o peptídeo Temphylarata (TEM) para a detecção de microrganismos de interesse clínico. Microscopia de força atômica (AFM) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foram usados na caracterização dos nanomateriais. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (VC) foram usados na caracterização de montagem da plataforma e detecção dos microrganismos alvo. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* foram preparadas e suspensas em meio aquoso em diferentes concentrações e submetidos a testes com eletrodos de ouro funcionalizados com a plataforma sensora nanoestruturada contendo o peptídeo TEM. O biossensor proposto se mostra promissor como técnica de auxílio aos métodos tradicionais de detecção de microrganismos.

**Palavras-chave:** Microrganismos. Eletroquímica. Biossensor. FTIR. Impedância.

Silva, Dryelli Frances Santana da. IMPEDIMETRIC BIOSENSOR BASED ON MAGNETIC NANOPARTICLES AND TEMPHYLARATA PEPTIDE FOR IDENTIFICATION OF BACTERIA OF CLINICAL INTEREST. 2024. 76 pages. Course Conclusion Work (Bachelor's Degree in Biomedicine) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) are a major global concern, leading to increased morbidity, mortality, and healthcare costs. Accurate and timely detection of microbial pathogens is critical for the management and prevention of these infections. Conventional microbial detection methods, such as culture techniques, polymerase chain reaction (PCR), and immunoassays, although widely used, have significant disadvantages. These include long processing times, high costs, and the need for specialized equipment and qualified personnel. Electrochemical biosensors have emerged as a promising and innovative approach for rapid and sensitive bacterial detection. By converting biological interactions into measurable electrical signals, these biosensors offer real-time detection with high sensitivity and specificity. Nanoparticles such as magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) play a crucial role in enhancing electrochemical platforms by offering high conductivity, surface area, and magnetic properties. Gold nanoparticles along with chitosane form the core-shell that adds stability to the sensing platform. These features improve sensitivity, enabling faster and more accurate detection in biosensing applications. Antimicrobial peptides (AMPs) are emerging as promising bioreceptors in electrochemical biosensor platforms due to their ability to selectively bind and disrupt microbial membranes. Their broad-spectrum activity, stability, and ease of functionalization make AMPs ideal for enhancing the sensitivity and specificity of bacterial detection. This work proposed the development of a biosensor platform based on self-assembled monolayers of cysteine,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  functionalized with chitosan (core-shell) and the Temphylarata peptide (TEM) for the detection of microorganisms of clinical interest. Atomic force microscopy (AFM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) were used in the characterization of the nanomaterials. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were used in the characterization of the platform assembly and detection of the target microorganisms. Gram-positive and Gram-negative bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* were prepared and suspended in aqueous medium at different concentrations and subjected to tests with gold electrodes functionalized with the nanostructured sensor platform containing the TEM peptide. The proposed biosensor shows promise as a technique to aid traditional methods of detecting microorganisms.

Keywords: Microorganisms. Electrochemistry. Biosensor. FTIR. Impedance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Mecanismo de resistência bacteriano                                                                                                              | 22 |
| <b>Figura 2</b> – Principais sítios de infecção bacteriana                                                                                                         | 23 |
| <b>Figura 3</b> – Componentes de um biossensor                                                                                                                     | 28 |
| <b>Figura 4</b> – Circuito equivalente de Randles                                                                                                                  | 39 |
| <b>Figura 5</b> – Processo de montagem da plataforma sensora                                                                                                       | 51 |
| <b>Figura 6</b> – Imagens tridimensionais dos componentes da plataforma sensora visualizadas por AFM                                                               | 52 |
| <b>Figura 7</b> – Análise FTIR dos componentes do sistema sensor                                                                                                   | 53 |
| <b>Figura 8</b> – Processo de montagem da plataforma sensora: análise impedimétrica (a) e voltamétrica (b)                                                         | 54 |
| <b>Figura 9</b> – Análise voltamétrica (a,c,e,g) e impedimétrica (b,d,f,h) da detecção dos microrganismos                                                          | 55 |
| <b>Figura 10</b> – Variação relativa da RCT do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos                                               | 58 |
| <b>Figura 11</b> – Quantificação do recobrimento da camada sensora ( $\theta$ ) após exposição a diferentes espécies de microrganismos em diferentes concentrações | 59 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Técnicas usadas para identificação e diferenciação de bactérias                                             | 24 |
| <b>Tabela 2</b> – Classificação dos biossensores                                                                              | 29 |
| <b>Tabela 3</b> – Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma | 57 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                      |                                                     |
|----------------------|-----------------------------------------------------|
| ABNT                 | Associação Brasileira de Normas Técnicas            |
| AMP                  | do inglês Antimicrobial Peptide                     |
| ANVISA               | Agência Nacional de Vigilância Sanitária            |
| AuNPs                | Nanopartículas de ouro                              |
| BGE                  | Eletrodo de barra de ouro                           |
| CPE                  | Elemento de fase constante                          |
| cys                  | do inglês Cysteamine                                |
| EDC                  | N-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida         |
| EIS                  | Espectroscopia de impedância eletroquímica          |
| ELISA                | do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay         |
| FTIR                 | Espectroscopia de infravermelho por transformada de |
| Fourier              |                                                     |
| IBGE                 | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística     |
| ipa                  | Correntes de pico anódicas (ipa)                    |
| IRAS                 | Infecções relacionadas à assistência à saúde        |
| MOMR                 | Microrganismos multirresistentes                    |
| MOR                  | Microrganismos resistentes                          |
| NHS                  | N-hidroxisuccinimida                                |
| OMS                  | Organização Mundial da Saúde                        |
| PCR                  | Reação em cadeia de polimerase                      |
| RCT                  | Resistência à transferência de carga                |
| SAM                  | Monocamada autotomada                               |
| UFC mL <sup>-1</sup> | Unidades formadoras de colônia por mL               |
| UTI                  | Unidade de tratamento intensivo                     |
| UV-vis               | Espectroscopia UV/visível                           |
| VC                   | Voltametria cíclica                                 |
| $\Delta I$           | Varição da corrente anódica                         |
| $\Delta RCT$         | Varição da resistência à transferência de cargas    |
| TEM                  | Peptídeo tenphylarata                               |

## Sumário

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                               | <b>14</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                    | <b>17</b> |
| 2.1 Infecções Relacionadas à Assistência À Saúde .....                  | 17        |
| 2.2 Infecções bacterianas: Resistência Antimicrobiana .....             | 18        |
| 2.3 Técnicas De Diagnóstico Microbiano .....                            | 21        |
| 2.3.1 Bacterioscopia .....                                              | 22        |
| 2.3.2 Meios de Cultura .....                                            | 22        |
| 2.3.3 Bioquímica .....                                                  | 23        |
| 2.3.4 Técnicas De Diagnóstico Avançado .....                            | 23        |
| 2.3.4.1 Imunoensaios .....                                              | 23        |
| 2.3.4.2 Biologia molecular .....                                        | 24        |
| 2.4 Biossensores .....                                                  | 24        |
| 2.4.1 Biossensores Gravimétricos .....                                  | 27        |
| 2.4.2 Calorimétricos ou Térmicos .....                                  | 28        |
| 2.4.3 Ópticos .....                                                     | 28        |
| 2.4.4 Eletroquímicos .....                                              | 29        |
| 2.5 Biorreceptores .....                                                | 31        |
| 2.5.1 Enzimáticos .....                                                 | 32        |
| 2.5.2 Imunossensores .....                                              | 33        |
| 2.5.3 Celulares .....                                                   | 33        |
| 2.5.4 Genossensores .....                                               | 34        |
| 2.6 Técnicas De Caracterização Para Biossensores .....                  | 34        |
| 2.6.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) .....            | 35        |
| 2.6.2 Voltametria Cíclica (VC) .....                                    | 36        |
| 2.6.3 Microscopia de Força Atômica (AFM) .....                          | 36        |
| 2.6.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier ..... | 37        |
| 2.7 Estratégias De Funcionalização De Superfícies Sensoras .....        | 38        |

|                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7.1 Nanomateriais.....                                                                            | 38        |
| 2.7.2 Núcleo-casca .....                                                                            | 40        |
| 2.7.3 Monocamadas Automontadas .....                                                                | 40        |
| 2.7.4 Peptídeos Antimicrobianos .....                                                               | 40        |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                                                            | <b>42</b> |
| 3.1 Objetivos gerais.....                                                                           | 42        |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                                     | 42        |
| <b>4 METODOLOGIA .....</b>                                                                          | <b>44</b> |
| 4.1 Materiais .....                                                                                 | 44        |
| 4.2 Imobilização De Camada Automontada.....                                                         | 44        |
| 4.3 Síntese De Nanopartículas Magnéticas.....                                                       | 44        |
| 4.4 Síntese De Nanopartículas De Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Ouro@Quitosana (Núcleo-Casca)..... | 45        |
| 4.5 Cultura Dos Microrganismos E Experimentos De Biorreconhecimento .....                           | 46        |
| 4.6 Caracterização Eletroquímica .....                                                              | 46        |
| 4.7 Caracterização Morfológica e Estrutural .....                                                   | 47        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                | <b>48</b> |
| 5.1 Plataforma Sensora Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Au@Qui-TEM.....                              | 48        |
| 5.2 Caracterização Topográfica.....                                                                 | 48        |
| 5.2.1 AFM .....                                                                                     | 48        |
| 5.3 Caracterização Eletroquímica da Plataforma Sensora .....                                        | 50        |
| 5.4 Performance Analítica do Biossensor .....                                                       | 52        |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                                                            | <b>57</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                            | <b>58</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um dos eventos adversos mais frequentes associados à assistência à saúde e um problema de saúde pública (Lemiech-mirowska et al. 2021). As IRAS possuem um impacto amplo, incluindo maior tempo de internação e maior mortalidade, principalmente quando as infecções são associadas à multirresistência (Oliveira et al., 2022).

A proliferação e o crescimento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes são um sério problema de perigo à saúde pública. O termo ESKAPE designa os patógenos mais comuns em infecções, como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* (Ma et al., 2020). Além desses, outros agentes patogênicos, como *Enterococcus faecalis* e *Bacillus* spp. são destacados nas análises de infecções alimentares, o que resulta em uma grande mortalidade (Enosi Tuipulotu et al., 2021).

As técnicas tradicionais empregadas na área da microbiologia como a microscopia, o cultivo em ágar e os testes bioquímicos, apesar de consolidados, possuem uma série de problemas que limitam seu uso, um desses problemas é o tempo para o resultado. Em vista disso, métodos de diagnóstico para identificação de bactérias que possibilitem a diminuição no tempo de resposta são essenciais, logo com a criação de biossensores pode-se sanar essa necessidade (Fatima et al., 2022).

O biossensor eletroquímico é um dispositivo que transforma uma informação química em um sinal que pode ser transformado em dados analisáveis, sendo formado por um receptor e um transdutor (M. F. Amaral et al., 2023). Este grupo de

sensores permite obter informações a partir da relação entre concentração e corrente elétrica, por possuírem baixo custo e grande seletividade são uma escolha interessante no ramo do diagnóstico microbiológico (Ávila Oliveira et al., 2024).

A área de biossensores está em constante evolução e representa um mercado diverso, sendo estimado ter alcançado mais de US\$25 bilhões em 2021, podendo chegar a US\$37 bilhões até 2026 (Sannegowda, 2021). Um biossensor é formado por três elementos principais: o receptor biológico, o transdutor e o detector. (Bhalla et al., 2016; Leva-bueno et al. 2020).

As nanopartículas magnéticas (MNPs) possuem características físico-químicas úteis no desenvolvimento de biossensores pelo seu caráter semicondutor, aprimorando a cinética de elétrons, além de elevada área de superfície, favorecendo a ampla imobilização de biorreceptores (Ramya et al., 2022). Outra nanopartícula usada no biossensor são as AuNps que possuem propriedades de baixa toxicidade e capacidade de ligar-se com vários materiais biológicos (Sani et al., 2021). Dentre esses materiais biológicos, temos a quitosana que é uma proteína que possui propriedades antimicrobianas (Rizeq et al., 2019). Contudo sua função no biossensor, em forma de nanopartículas, é de compor o núcleo-casca. As MNPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au@Quit}$  formam o núcleo-casca, onde a casca atua como uma separação física entre o meio circundante e o ativo, tornando as nanoestruturas menos propensas a flutuações ambientais, alteração na química da superfície e prevenção de foto-oxidação (Singh e Bhateria, 2021). Biossensores combinados com nanopartículas magnéticas permitem otimização do sistema sensor tornando-o mais sensível (Jacinto et al., 2021).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são proteínas de baixo peso molecular com propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-negativas e Gram-

positivas, vírus e fungos (Boparai e Sharma, 2019). Os PAMs desempenham um papel importante na resistência a microrganismos invasores sendo ativos contra cepas resistentes a antibióticos, além de não induzir facilmente o desenvolvimento de resistência a medicamentos (Li et al., 2022). O peptídeo Temphylarata (TEM), análogo do peptídeo Temporina-pta, é um PAM sintético bioinspirado obtido da secreção cutânea da pele de anfíbio (*Hylarana Picturata*) que possui potencial para se tornar uma alternativa promissora para questão de resistência bacteriana e no uso em sistemas sensores voltados para a detecção de bactérias e fungos, empregando sua habilidade de interação com a parede celular microbiana (Souza e Silva et al., 2022).

Portanto, o atual estudo propôs desenvolver um biossensor nanoestruturado baseado em monocamadas automontadas de cisteína (Cys), nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) revestidas por casca de ouro (Au) e quitosana (núcleo-casca de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Au-Quit) associados ao peptídeo Temphylarata para a biodetecção de bactérias de interesse clínico. Microscopia de força atômica (AFM) foi usada no estudo topográfico do sistema sensor. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia UV-Vis também foram usadas na avaliação das nanopartículas sintetizadas. Técnicas eletroquímicas como a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram usadas na avaliação do processo de montagem do sistema sensor, bem como no estudo de detecção e diferenciação dos microrganismos alvo. Os microrganismos estudados compreendem as gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, e a gram-positiva: *Staphylococcus aureus*, que foram suspensas em meio aquoso em diferentes concentrações.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são consideradas qualquer infecção resultante dos serviços prestados pela atenção à saúde. Os riscos de IRAS resultantes de intervenções médicas, como uso de dispositivos, uso de antibióticos e equívocos no controle de infecções acompanham o paciente à medida que se transferem entre os setores do hospital (Tesini & Dumyati, 2023). As complicações infecciosas podem surgir ao longo de diferentes tipos de dependências (UTIs e ambulatorios) (Rinke et al., 2020). As IRAS são caracterizadas por resultar em aumento na morbidade e mortalidade, sendo alguns exemplos comuns a ITU (infecção do trato urinário), infecção da corrente sanguínea e pneumonia (Cagle et al., 2022).

Além de desencadear problemas de saúde pública, as IRAS constituem um grave problema socioeconômico. Essas infecções são consideradas mais comuns em países em desenvolvimento pois a falta de recursos para estudos epidemiológicos e fiscalização interferem na solução desse problema (Leal et al., 2021).

No Brasil, a IRAS é caracterizada como qualquer intercorrência que ocorra após 72 horas da sua entrada na unidade de saúde, ou anterior a ela, mas que esteja associada ao cuidado de saúde fornecido, segundo o Ministério da Saúde portaria nº 2.616 (Lopes Araújo et al., 2018). Em comparação, no Brasil, a taxa de incidência dessas infecções corresponde ao dobro do que no continente Europeu.

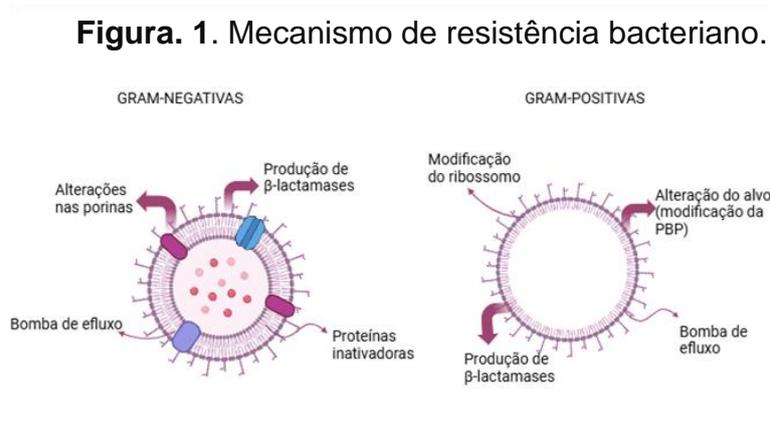
Muitos esforços são realizados para redução da incidência de IRAS e seus efeitos, intervenções de prevenção e controle de infecções, como higiene de mãos e profilaxia perioperatória, podem reduzir a ocorrência de IRAS (Glowicz et al., 2023). No entanto, programas de prevenção são encontrados em quantidades reduzidas e de forma heterogênea no mundo. Segundo dados do Tripartite Antimicrobial Resistance Country Self-assessment Survey (TrACSS), um sistema para monitorização do progresso da implementação do plano de ação global de resistência antimicrobiana, cerca de 24% dos países relataram possuir programas de prevenção e controle de infecção implementados em âmbito nacional (Balakrishnan, 2022).

Portanto, o aprimoramento e a inovação são essenciais para a defesa contra as infecções na assistência à saúde no Brasil. Para que isso ocorra, novas técnicas de diagnóstico com uma metodologia precisa e eficaz são essenciais, uma vez que as técnicas atuais possuem limitações quanto ao tempo e especificidade.

## 2.2 INFECÇÕES BACTERIANAS: RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (RAM) está desenvolvendo-se com rapidez e um medo global é que sua evolução ultrapasse a velocidade de novos agentes antimicrobianos. Com a recombinação genética, as bactérias conseguem adquirir resistência e disseminar os genes que codificam essa característica (Morrison & Zembower, 2020). Os impactos negativos dessa recombinação, estão ligados ao aumento da morbidade e mortalidade, principalmente quando associados a multirresistência antimicrobiana (MOMR), para controlar a infecção faz-se uso de antibióticos de última geração causando uma pressão seletiva nos microrganismos

(Maia et al., 2021).

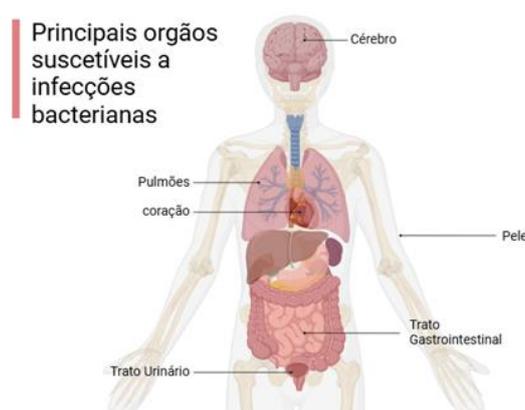


**Fonte:** próprio autor. 2024

Com o uso indiscriminado de antibióticos em todo mundo, uma oportunidade maior é dada para que as bactérias desenvolvam resistência contra esses antibióticos. No ambiente hospitalar, faz-se uso de antibióticos como penicilinas, cefalosporinas e quinolonas que já possuem microrganismos com resistência comprovada (Araújo et al., 2022). O mecanismo de resistência das bactérias (Figura 1) aos agentes antimicrobianos pode ser de origem intrínseca: logo, é uma característica natural de certas espécies bacterianas, o que significa que elas possuem uma resistência “inata” a determinados antimicrobianos, independentemente de exposição prévia. Essa resistência também pode ser adquirida, ocorrendo quando uma bactéria previamente sensível a um antimicrobiano desenvolve resistência devido à aquisição de novos genes. Ainda há a resistência adaptativa que é a resposta transitória e não hereditária, em que as bactérias desenvolvem resistência em resposta a condições ambientais específicas, como exposição ao próprio antimicrobiano em concentrações quase letais. (Christaki

et al., 2020). Esses mecanismos de resistência são uma preocupação por possuir alto custo no tratamento e níveis elevados de mortalidade associados.

**Figura 2.** Principais sítios de infecção bacteriana.



**Fonte:** próprio autor. 2024

Existe uma gama de microrganismos oportunistas, que causam infecções em vários sítios (Figura 2). Uma bactéria gram-positiva comum em infecções do trato respiratório e pele é a *Staphylococcus aureus* (Cheung et al., 2021). Dentre as gram-negativas pode-se mencionar as *Escherichia coli* que causa infecções gastrointestinais e no trato urinário (Riley, 2020). Somado, tem-se a *Pseudomonas aeruginosa*, também uma gram negativa, que está relacionada pneumonias (Tenover et al., 2022). Por fim, a *Acinetobacter baumannii*, um bacilo gram-negativo, muito comum em infecções do sistema respiratório (Ibrahim et al., 2021) Além disso, todos os microrganismos citados possuem em comum a produção de biofilme, que conferem a comunidade bacteriana proteção contra diversos tipos de agressões incluindo os antibióticos (Karygianni et al., 2020).

### 2.3 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MICROBIANO

Existe uma série de métodos de diagnóstico, um pequeno resumo é apresentado na tabela 1, empregados para identificação de bactérias de interesse clínico e caracterização dessas bactérias patogênicas. Estes métodos são essenciais para direcionar o tratamento e cura do paciente através de seus resultados. Contudo, possuem limitações quando observamos seu elevado tempo e custo. Por isso, os biossensores trazem inovação e segurança para um diagnóstico preciso e rápido.

**Tabela 1.** Métodos diagnósticos e sua descrição.

| Método de Diagnóstico                                       | Descrição                                                                                         | Aplicação comum                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Prova Bioquímica (API, VITEK)</b>                        | Bateria de testes bioquímicos que avaliam o metabolismo bacteriano (ex: fermentação de açúcares). | Identificação de bactérias com base em perfis metabólicos (ex.: enterobactérias, pseudomonas).                  |
| <b>PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)</b>                 | Amplificação de DNA bacteriano para detectar sequências específicas.                              | Diagnóstico rápido e preciso de infecções bacterianas como <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Chlamydia</i> |
| <b>Teste de Sensibilidade a Antibióticos (Antibiograma)</b> | Avalia a resistência de bactérias a diferentes antibióticos                                       | Determinação do tratamento antimicrobiano mais eficaz, como em infecções por <i>Staphylococcus</i> resistente   |
| <b>Teste de Coagulase</b>                                   | Detecta a presença da enzima catalase, que decompõe o                                             | Diferencia (positivo) de <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i>                                           |

peróxido de hidrogênio (negativo)

---

|                           |           |                                                                                      |                                                                                  |
|---------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Microscopia</b>        | <b>de</b> | Utiliza anticorpos marcados com fluorescência para identificar bactérias específicas | Diagnóstico de infecções bacterianas como <i>Legionella</i> e <i>Treponema</i> . |
| <b>Imunofluorescência</b> |           |                                                                                      |                                                                                  |

---

**Fonte:** Próprio autor, 2024.

### 2.3.1 BACTERIOSCOPIA

A bacterioscopia é uma técnica de diagnóstico que permite identificar com rapidez e facilidade a ocorrência de infecções, por meio de técnicas de coloração. Um microscópio óptico é o instrumento mais intuitivo, simples e comumente usado para observar objetos e discutir comportamentos através de imagens (Lemineur et al., 2022). A partir da coloração de Gram, a microscopia óptica conseguiu classificar as bactérias segundo a sua forma, tamanho, arranjo e coloração (Rohde, 2011).

### 2.3.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura são essenciais na microbiologia, pois permitem o crescimento e a manutenção de microrganismos em laboratório para estudo. Eles fornecem nutrientes, pH adequado, e condições ideais, como umidade e oxigênio, imitando o ambiente natural dos microrganismos (Al-blooshi et al., 2021) Com isso, torna-se possível isolar e identificar bactérias, fungos e outros patógenos, sendo fundamentais para diagnósticos clínicos e pesquisas científicas. Além disso, os

meios de cultura permitem testar a resistência a antibióticos, estudar o metabolismo microbiano e desenvolver vacinas (Mohammed et al., 2022). A escolha do meio correto influencia diretamente a eficiência e a precisão dos resultados.

### 2.3.3 BIOQUÍMICA

Testes bioquímicos desempenham um papel essencial na identificação bacteriana ao permitirem diferenciar bactérias com base nas suas características enzimáticas e metabólicas (Shoib et al., 2020). Estes testes ajudam a identificar espécies bacterianas em contextos clínicos, ambientais e industriais, possibilitando a determinação do agente causador de infecções e orientando o tratamento. O teste de **catalase**, por exemplo, diferencia bactérias como *Staphylococcus* (catalase-positivas) de *Streptococcus* (catalase-negativas), sendo útil na identificação inicial de bactérias Gram-positivas (Al-joda et al., 2021). Já o teste de **oxidase** permite distinguir *Pseudomonas* (oxidase-positiva) de enterobactérias (oxidase-negativas), útil para bactérias gram-negativas (Brito et al., 2021). No entanto, a bioquímica convencional mostrou ser bastante demorada, podendo variar entre algumas horas.

### 2.3.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO AVANÇADO

#### 2.3.4.1 IMUNOENSAIOS

Ao permitir detectar e quantificar antígenos e anticorpos, os imunoenaios se tornam uma grande carta na manga da medicina diagnóstica. Essas técnicas utilizam a interação específica entre antígenos e anticorpos. Além dos marcadores fluorescentes ou quimioluminescentes conjugados aos anticorpos que possuem a

função de aumentar o sinal, auxiliando a visualização ou detecção (Chorti et al., 2021). Alguns exemplos de imunoenaios destaca-se a imunocromatografia, imunofluorescência e o ELISA (Perantoni et al., 2019).

#### 2.3.4.2 BIOLOGIA MOLECULAR

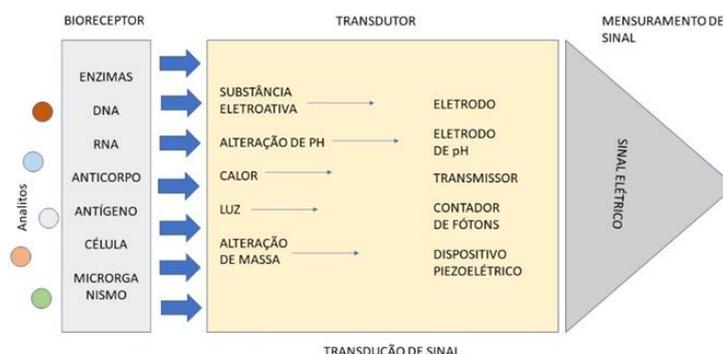
A identificação de microrganismos obteve avanços significativos desde a aplicação de biologia molecular. Essa técnica exige pouco material, possibilita a análise da resistência antimicrobiana e a determinação de relações filogenéticas (Church et al., 2020; Peranton et al., 2019). Contudo, possuem um custo elevado e equipamentos especiais para sua elaboração.

#### 2.4 BIOSSENSORES

O biossensor é um sistema analítico que detecta uma analito biológico, cujo o alvo é uma biomolécula, que traduz as informações de presença e/ou concentração em dados, como sinais elétricos, ópticos e térmicos, sendo uma operação simples, de baixo custo e rapidez (Makvandi et al., 2021; Mohankumar et al., 2021; Presutti et al., 2022). Clark e Lyons iniciou as pesquisas envolvendo biossensores em 1962 com o projeto envolvendo a detecção de oxigênio no sangue usando enzimas (Abid et al., 2021). Contudo, foi com Updike e Hickey em 1967 que houve o surgimento do primeiro biossensor para medição da glicose que os estudos no ramo aumentaram. Nos dias atuais é possível observar as variações dos biossensores para glicose presentes no mercado. Além do monitoramento da glicose, os biossensores são usados para detectar e medir patógenos específicos,

produtos químicos e tóxicos (Naresh and Lee, 2021). Esse emprego diverso é resultado do aperfeiçoamento de ferramentas de diagnóstico específicas por meio da integração de elementos de detecção biológica, cujo o principal objetivo é a detecção de alvos específicos dispersos em uma amostra de maneira rápida e de baixo custo (Presutti et al., 2022). Os biossensores detêm diferentes formas, funções e tamanhos, sendo essas características ligadas ao objetivo da análise. Os biossensores devem possuir alta sensibilidade, seletividade, linearidade, reprodutibilidade, alto alcance e resolução, proporcionando baixo desvio e tempo de resposta ( Naresh and Lee, 2021). São compostos por um sistema de detecção constituído por um receptor, um transdutor e um sistema de leitura cuja junção é capaz de medir diretamente um analito alvo disperso em uma amostra (Huang et al., 2021). Depois da detecção do sinal, ele é registrado e transmitido para um display (Li et al., 2021; Naresh and Lee, 2021). A interação do elemento biológico com o alvo resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas, produzindo sinais (Li et al., 2021). A resposta final é medida de forma qualitativa e/ou quantitativa de um analito a partir da ligação bioreceptor-alvo.

**Figura 3.** Componentes de um biossensor.



**Fonte:** próprio autor, 2024

A classificação dos biossensores é feita a partir dos transdutores e

biorreceptores utilizados em sua produção. Os transdutores são classificados em eletroquímicos, acústicos, colorimétricos e ópticos (Lopes et al., 2022). Todavia, os principais biorreceptores são classificados como enzimáticos, imunossensores, genossensores, celulares, biométricos.

**Tabela 2.** Tipos de biossensores baseados no tipo de receptor.

| TIPO DE RECEPTOR   | TIPO DE TRANSDUTOR | DESCRIÇÃO                                                                                              |
|--------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Enzimático</b>  | Eletroquímico      | Baseado em enzimas que catalisam reações e geram sinais detectados eletricamente.                      |
| <b>Imunológico</b> | óptico             | Usa anticorpos para detectar antígenos com a detecção de mudanças em propriedades ópticas              |
| <b>Celular</b>     | Piezoelétrico      | Células vivas são usadas para reconhecer estímulos químicos ou físicos, detectando alterações na massa |
| <b>Aptâmero</b>    | óptico             | Aptâmeros reconhecem moléculas-alvo, com a detecção baseada em alterações ópticas                      |

(fluorescência).

---

**Fonte:** Próprio autor, 2024.

Um transdutor é um dispositivo que pode converter energia e são caracterizados com base em métodos de transdução do sinal (Naresh and Lee, 2021). Variando de acordo com sua forma ou função, o transdutor pode se adequar às medidas de interesse. Já o tipo de transdução de sinal segue as características químicas e físicas da reação gerada pelo componente biológico. As perturbações da interação do alvo com o receptor são recebidas pelo transdutor e convertidas em sinais mensuráveis que podem ser eletronicamente visualizados, amplificados e armazenados. O seu princípio operacional categoriza os transdutores em gravimétricos, térmicos, ópticos e eletroquímicos (Naresh and Lee, 2021).

#### 2.4.1 BIOSSENSORES GRAVIMÉTRICOS

São biossensores baseados em pequenas mudanças na massa do material de ligação, com proteínas ou anticorpos na superfície, gerando um sinal mensurável (Naresh and Lee, 2021). São utilizados finos cristais de quartzo piezoelétrico, que vibram em frequências específicas de acordo com a corrente aplicada e a massa do material detectado (Cali et al., 2020). Portanto, à medida que a massa aumenta, resultado do biorreconhecimento, a frequência oscilante diminui e o sinal pode ser analisado (Antiochia, 2021). Os transdutores gravimétricos mais empregados são sensores baseados em magnetoelásticos (MES), microbalança de cristal de quartzo (QCM) e piezoelétricos. Entre esses, a abordagem piezoelétrica se destaca por apresentar várias características atraentes como sensibilidade devido ao

alto módulo de elasticidade, monitoramento em tempo real, custo-benefício, alto limite de detecção, frequência, estabilidade e linearidade (Lu et al., 2020; h. Li et al., 2022).

#### 2.4.2 CALORIMÉTRICOS OU TÉRMICOS

Os transdutores térmicos trabalham basicamente com a detecção do analito via variação de temperatura, logo as mudanças no calor produzido ou consumido em uma reação química são medidas ao longo de um tempo. A energia liberada ou absorvida é proporcional à entalpia molar e ao número de moléculas do produto criado na reação (Eyvazi et al., 2021). Essa alteração é diretamente proporcional à quantidade de reagentes consumidos ou produtos formados, assim, à quantidade de analito alvo. Porém, algumas informações dos sensores térmicos não são totalmente confiáveis devido a fatores como perda de calor e deformação do sensor (Bordbar et al., 2021). Os termopares, termistores e semicondutores são bastante usados nessa forma de detecção.

#### 2.4.3 ÓPTICOS

Os transdutores ópticos são fundamentados nas propriedades ópticas, permitindo quantificar a concentração do analito por meio da modificação da luz emitida por um sistema reacional, seja biológico ou químico (Ekrami et al., 2021). Vários fenômenos físicos químicos podem ser observados como: absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência e refletividade (Antiochia, 2021). Os biossensores ópticos mais comuns são baseados em fluorescência,

quimioluminescência, ressonância, de plasmon de superfície e a (SPR) e fibra óptica (Abid et al., 2021). A fluorescência e a SPR são as mais aplicadas (Antiochia, 2021). Os biossensores ópticos apresentam bom desempenho na detecção de sistemas biológicos, proporcionando avanços significativos em diagnósticos, na área de fármacos, controle de qualidade de alimentos e monitoramento ambiental (Chen and Wang, 2020).

#### 2.4.4 ELETROQUÍMICOS

Os biossensores eletroquímicos são capazes de converter sinais biológicos em sinais elétricos, com o uso de enzimas como integrante mais usado por sua capacidade específica de ligação com o alvo e atividade biocatalítica (Ekrami et al., 2021). Logo, à medida que ocorre o consumo ou geração de conjuntos eletroativos durante a reação, o transdutor processa e quantifica a concentração do analito presente na amostra. Essa resposta varia de acordo com a mudança de alguns fatores, como: corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. A transferência de elétrons acontece na interface do eletrodo – solução, os elétrons transferem-se entre uma espécie e o eletrodo ou viceversa. Nessa técnica, usamos o potenciostato para controlar o potencial aplicado e medir as correntes do eletrodo de trabalho. Os biossensores eletroquímicos são gerais por seus princípios e funcionamento, aspirando as propriedades eletroquímicas do conversor e do analito (Malecka-baturo, 2022). Suas vantagens permeiam a seletividade, condutividade, estabilidade, baixo custo (Lu et al., 2020). Ademais, os biossensores eletroquímicos podem ser miniaturizados, rápidas respostas e em tempo real (Lakard et al., 2021). Subdivididos em biossensores eletroquímicos amperométricos,

condutimétricos, impedimétricos, potenciométricos e voltamétricos (Naresh and Lee, 2021). Os biossensores amperométricos fundamentam-se na aplicação de potencial para gerar uma corrente elétrica, resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo (Oliveira, 2017). Sendo a corrente diretamente proporcional à concentração/alvo presente na amostra analisada. Um requisito para o desenvolvimento dos biossensores amperométricos é estabelecer uma transferência rápida de elétrons do componente biológico para o eletrodo. Esse tipo de dispositivo é usado no monitoramento de marcadores ambientais, indústrias, fármacos no sangue e urina, biomarcadores para doenças e infecções (Schachinger et al., 2021). Os biossensores potenciométricos detectam concentrações de íons dispersos em uma amostra. A partir da diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho (ET) e o eletrodo de referência (ER) em condições de corrente elétrica constante é medida. Os **biossensores potenciométricos** mencionam a concentração e atividade de íons livres, diferente da função de outros métodos analíticos que fornecem concentrações totais de determinado alvo. Suas vantagens são o tamanho reduzido, rápida resposta, facilidade de uso, baixo custo e resistência a interferências externas (Ding and Qin, 2020). Os biossensores condutimétricos são baseados na mudança da condutividade da solução apresentada. Não necessita da utilização de eletrodo de referência, já que a condutividade dos eletrólitos varia de acordo com a exposição a diferentes soluções. Logo, os sinais obtidos dependem da temperatura (Xu et al., 2017). Contudo, existe difícil manipulação dos dispositivos, porém quando usados concedem analisar alterações de condutância por uso de enzimas que consomem ou produzem constituintes iônicos alterando o número de cargas do eletrólito (Villalonga et al., 2022). Apesar de sua desvantagem, esses biossensores podem ser miniaturizados, produzidos em larga escala e com baixo

custo, esses dispositivos são utilizados para monitorar processos metabólicos em sistemas vivos (Naresh and lee, 2021). Os **impedimétricos** verificam as mudanças na impedância da superfície do sensor à decorrer da ligação seletiva do alvo (Kim et al., 2019). O potencial/corrente pode ser detectado por meio de uma ampla faixa de frequência de corrente/potencial alternada. A impedância( $Z$ ) é definida como a razão entre o potencial senoidal e a corrente, concedendo análises dos processos interfaciais do eletrodo, como transferência de cargas e difusão de espécies eletroativas (Wang et al., 2021). A técnica de Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) fornece uma análise de alguns parâmetros celulares e propriedades interfaciais do alvo presente na amostra. Após cada modificação a interação entre o biorreceptor do analito causa mudanças na impedância da superfície do eletrodo de trabalho podendo aumentar ou diminuir a resistência à transferência de cargas (Antiochia, 2022). Finalmente, os **biossensores voltamétricos** muito parecido aos amperométricos baseando-se na medição da corrente-potencial, contudo, a corrente resultante das interações analito com o elemento de reconhecimento é medida durante variações controladas do potencial e não em um potencial fixo diferente da amperometria (Ferreira, 2014). Portanto, os níveis de corrente são acompanhados em função do potencial aplicado, tendo a faixa de varredura adaptada para cada situação. Para detecção voltamétrica usa-se a voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de pulso de onda quadrada (SWV) (Liu et al., 2022).

## 2.5 BIORRECEPTORES

Para produzir um sinal mensurável o biorreceptor reage

especificamente com o analgésico de interesse para produzir um sinal mensurável. Os biorreceptores agem como sensores em função das propriedades bioquímicas, tornando-os sensíveis e seletivos para reconhecimento de biomarcadores com mínima interferência de outros microrganismos ou moléculas presentes na amostra em análise (Abid et al., 2021). Sua alta especificidade e forte interação das sondas biológicas com as moléculas alvo formam ligações mais eficientes com o analito (Farzim et al., 2018). Vários biorreceptores são desenvolvidos com a finalidade de evitar ao máximo a interferência de agentes não específicos na análise e na interpretação dos dados. Os elementos de reconhecimento podem ser classificados em três grupos: os de afinidade, que se fundamentam na interação do ligante com o receptor; os catalíticos, cuja interação do receptor com o alvo forma um novo produto detectável pelo transdutor e os biomiméticos que apresentam semelhança com os sistemas específicos enzima-substrato (Soto & Orozco, 2022)

Assim sendo, existe uma variedade de biorreceptores que podem ser explorados. Abaixo serão descritos os biossensores classificados de acordo com a variedade de moléculas biológicas existentes.

### 2.5.1 ENZIMÁTICOS

Os biossensores enzimáticos são aparelhos analíticos que utilizam enzimas como componente de reconhecimento biológico para detectar a presença do alvo. Esses dispositivos funcionam através da mudança de uma reação química em um sinal (elétrico ou óptico), permitindo quantificar a substância alvo. As biomoléculas enzimáticas possuem propriedades específicas em relação a substratos, além de sua capacidade de serem inibidas usando análogos, logo atraem atenção dos

pesquisadores (Kaur et al., 2019). Quando comparado a outros receptores, os enzimáticos possuem uma excelente seletividade e alta atividade catalítica (Silvestri et al., 2022). São aplicados para detecção de biomarcadores como patógenos e doenças, apresentando alto desempenho e confiabilidade.

### 2.5.2 IMUNOSENSORES

Esses dispositivos utilizam a interação entre um antígeno e um anticorpo (interação Ag-Ab) para detectar ou quantificar a concentração de um analito em uma amostra ao converter um sinal bioquímico em um sinal elétrico (Hassan et al., 2022). Inicialmente prepara-se a superfície de detecção do imunossensor, constituída por material sólido (vidro ou sílica) que é funcionalizado com anticorpos específicos para o analito pesquisado. Os anticorpos são imobilizados na superfície, ao ser exposto a amostra os analitos presentes na amostra irão se ligar aos anticorpos imobilizados (ligação antígeno-anticorpo) (Li et al., 2022). Com a formação desses complexos, usa-se as técnicas de espectroscopia, eletroquímica e a impedância elétrica para detectar a formação desses complexos (Ali et al., 2022)

### 2.5.3 CELULARES

Conhecidos como microbiológicos, os biossensores celulares possuem estruturas celulares como elemento de reconhecimento. Os tipos celulares mais usados para desenvolver o biossensor são as células bacterianas, algas, fúngicas, peixes, ratos e seres humanos (Ye et al., 2019). Fundamentam-se na

capacidade da célula em detectar condições do ambiente intra e extracelular, gerando uma resposta quando interagem com o alvo. Ao sentir os estímulos externos, o sinal gerado passa pelo transdutor que converte e amplifica, apresentando a concentração do alvo conhecido na amostra analisada (Zhang et al., 2021).

#### 2.5.4 GENOSENSORES

O princípio de funcionamento dos genossensores embasa-se na hibridação do oligonucleotídeo sonda com a sequência complementar presente na amostra, produzindo uma dupla hélice, o que resulta em uma mudança detectável no sinal do sensor (Zidarič et al., 2022). Esses dispositivos são aplicados em várias áreas como no diagnóstico de doenças, monitoramento ambiental, testes de segurança alimentar e identificação de espécies (Romanholo et al., 2021).

#### 2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO PARA BIOSSENSORES

As técnicas eletroquímicas fornecem dados quase instantâneos e de alta sensibilidade, consequentemente proporcionando que substâncias e biomoléculas sejam detectadas em níveis baixos. Os sinais eletroquímicos são abundantes e complexos, dependendo da escolha dos materiais dos eletrodos, logo existe a dificuldade em identificar e categorizar os materiais com base em sinais eletroquímicos (Deebansok et al., 2024).

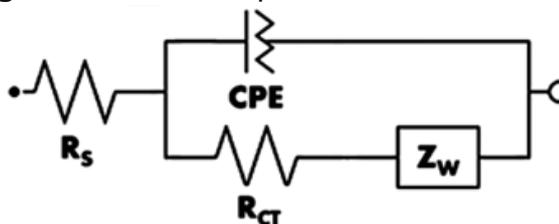
### 2.6.1 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA (EIS)

A EIS é utilizada em ampla gama de estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas, ou seja, processos que ocorrem em baterias de íons de lítio, células fotovoltaicas, sistemas de corrosão e/ou processos eletrocatalíticos (Kaci et al., 2023)

A EIS é uma técnica utilizada na análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução eletrolítica (Singh et al., 2021). Tal técnica consiste na aplicação de uma tensão variável (em frequência  $f$ ) e medida da impedância  $V/I$ . O sistema eletroquímico é modelado como um conjunto capacitor/indutor/resistor e a variação de comportamento em função da frequência revela os mecanismos eletroquímicos. Essa característica é analisada no desenvolvimento de biossensores impedimétricos, no qual a impedância é medida ao decorrer de uma faixa de frequência (Vivier e Orazem, 2022). Logo, a EIS proporciona a avaliação da interação bioreceptor com o analito alvo através das variações impedimétricas. Através dos diagramas de Nyquist são identificados os resultados de impedância, com o uso da área do semicírculo que corresponde ao processo de transferência de elétrons na superfície. Os elétrons formam uma linha reta quando a superfície do eletrodo é estimulada, formando assim o processo de difusão, já quando há resistências na transferência dos elétrons um semicírculo é formado. A EIS é uma técnica excelente e já bem estabelecida para caracterização de sistemas eletroquímicos que não se alteram no tempo, pelo menos naquele necessário para que medida seja realizada. O circuito equivalente de Randles (Figura 4) é utilizado na obtenção dos dados numéricos das análises impedimétricas. O circuito mimetiza a interface eletrodo-solução eletrolítica, apresentando

componentes elétricos como resistores e capacitores.

**Figura 4.** Circuito equivalente de Randles.



**Fonte:** Próprio autor, 2024.

### 2.6.2 VOLTAMETRIA CÍCLICA (VC)

A voltametria cíclica é a técnica mais usada para analisar qualitativamente os processos eletroquímicos. Essa técnica apresenta dados sobre a termodinâmica dos processos redox, da cinética de reações de transferência de elétrons e sobre as reações químicas acopladas a processos absorptivos. Ao aplicar o potencial em um valor onde não ocorre redução, na região mais negativa (catódica) ocorre a redução do composto em solução, formando um pico de corrente proporcional à concentração do composto. Quando o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial. No caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução.

### 2.6.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) gera imagens de alta resolução em escala nanométrica e analisa as propriedades mecânicas, sendo

essenciais na análise de biossensores ao fornecer informações sobre topografia e impressões biomecânicas (Rouso et al., 2022). O AFM foi descrito pela primeira vez em 1986, sendo hoje uma técnica bem estabelecida, pode ser utilizada para caracterização por imagem e biomecânica de amostras biológicas em nível nanométrico (Peña et al., 2022). Para realizar recursos de imagem de topografia em nanoescala, um AFM precisa de três subsistemas: de uma sonda cantilever, do sistema de nanoposicionamento e do sistema eletrônico do condutor (Xia et al., 2022). Sua função baseia-se no conceito de medir as forças de interação entre a ponta afiada, montada no cantilever, e a superfície da amostra. O cantilever funciona como uma mola, respondendo às forças de atração ou repulsão entre a ponta e os átomos. Um laser é refletido na parte traseira do cantilever, e sua deflexão é detectada por meio de um fotodetector, permitindo a obtenção de informações mecânicas e topográficas. Os sistemas de balanço (ponta de sonda a sonda) podem ser feitos de materiais distintos, como silício e nitreto.

#### 2.6.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica usada para caracterizar as estruturas moleculares de um material. As moléculas têm níveis de energia discretos para transições eletrônicas, vibrações moleculares e rotações moleculares. Quando uma molécula é irradiada por luz infravermelha, ela absorve uma certa quantidade da radiação incidente em uma energia/frequência específica e sofre excitação vibracional do estado fundamental para um estado de energia vibracional mais alto. O padrão único de absorção no infravermelho por uma molécula particular ou grupo funcional produz

bandas características em seus espectros FTIR (R. Wang et al, 2021). Esse espectro, composto por picos de absorção em diferentes regiões do espectro infravermelho, fornece informações sobre a composição química, estrutura molecular e identificação de grupos funcionais presentes na amostra.

## 2.7 ESTRATÉGIAS DE FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES SENSORAS

A funcionalização adequada de superfícies sensoras é um aspecto crucial no desenvolvimento de plataformas biossensoras eletroquímicas, pois influencia diretamente a sensibilidade, seletividade e estabilidade dos sensores. A modificação da superfície com materiais específicos, como nanopartículas, polímeros condutores ou biomoléculas, permite a imobilização eficiente dos biorreceptores, garantindo uma interação robusta e direcionada com o analito. Essa personalização otimiza a transdução do sinal eletroquímico, melhorando a detecção de pequenas concentrações de analitos em ambientes complexos. Além disso, uma funcionalização bem planejada pode minimizar interferências e melhorar a estabilidade do biossensor em diferentes condições experimentais.

### 2.7.1 NANOMATERIAIS

O desenvolvimento de nanomateriais é aplicável em várias áreas do mercado, incluindo o biomédico. Os nanomateriais podem ser constituídos por estruturas de carbono, nanopartículas metálicas, óxidos metálicos, materiais semicondutores, pontos quânticos e nanomateriais orgânicos, além dos nanocompósitos derivados da associação entre eles (Sheikhzadeh et al., 2021). Um

nanomaterial muito usado no biossensoramento são as nanopartículas de ouro (AuNPs) por suas características ópticas, eletrônicas, sensoriais e bioquímicas únicas. Devido a essas características, as AuNPs têm sido amplamente aplicadas em campos biomédicos, como diagnóstico, biossensoriamento e liberação de fármacos (Li et al., 2019). As nanopartículas magnéticas (NPMs) como a “magnetita” ou óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) é outro tipo de nanomaterial usado para formar a monocamada automontada, com suas propriedades de aumento da superfície e elevada área de transferência de massa, estabilidade térmica e química e baixa toxicidade fazem parte de nanomateriais usados no campo biomédico. Porém, para que as NPMs sejam aplicadas necessitam ser funcionalizadas com um material biologicamente ativo. As biomoléculas que podem ser utilizadas para funcionalizar NPMs devem apresentar alta massa molecular, boa estabilidade e sensibilidade, baixo custo, fácil conjugação entre o antígeno e a biomolécula, e detecção precisa. As biomoléculas mais comuns são dextran, polietileno glicol, álcool polivinílico e quitosana. Dentre estas biomoléculas, a quitosana é um biopolímero com estrutura química formando um polícatión linear, com elevada densidade de carga, atóxico, que apresenta grupos aminas e hidroxilas e inúmeras ligações de hidrogênio. Estas características permitem que exiba uma excelente biocompatibilidade (Albuquerque et al., 2017). Os nanomaterias são comumente usados em biossensores por aperfeiçoar o desempenho, permitindo uma detecção mais rápida, eficiente e acessível. Essas características se devem às propriedades elétricas únicas, que geram alta relação superfície-volume de contato, alta condutividade elétrica, atividade catalítica, biocompatibilidade, podendo ser facilmente modificadas com grupos funcionais (Mirres et al., 2022).

### 2.7.2 NÚCLEO-CASCA

Os usos de biopolímeros como amido, celulose, fibroínas de seda, colágeno, gelatina, albumina e nanomateriais à base de quitosana conferem aos NPs sintéticos biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Nanomateriais biocompatíveis com alta área de superfície específica são desejáveis em uma infinidade de aplicações biológicas e biomédicas, como administração de medicamentos, terapêutica e entrega de genes. Nos últimos anos, vários estudos se concentraram nos avanços neste campo, levando à substituição de nanomateriais biocompatíveis considerando o uso de recursos alternativos, propriedades inovadoras e limitações (Wang et al., 2020).

### 2.7.3 MONOCAMADAS AUTOMONTADAS

Uma monocamada auto-montada (SAM) é definida como um filme fino e de camada única de pequenas moléculas que estão ligadas a uma superfície de uma maneira altamente ordenada. Uma molécula capaz de se tornar uma monocamada automontada é composta de três partes: o grupo âncora, o grupo terminal e o ligante (Lundin et al., 2022). A técnica de SAM para funcionalização de superfícies é conhecida por sua notável versatilidade e eficácia, principalmente na imobilização de biomoléculas e nanopartículas sendo essencial na elaboração de biossensores.

### 2.7.4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

O problema da resistência aos medicamentos devido ao uso prolongado de antibióticos tem sido uma preocupação há anos. À medida que esse problema se agrava, as infecções causadas por várias bactérias estão se expandindo rapidamente e são extremamente prejudiciais à saúde humana. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são uma boa alternativa aos antimicrobianos atuais com potente atividade antimicrobiana e mecanismos antimicrobianos únicos, que apresentam vantagens sobre os antibióticos tradicionais no combate a infecções bacterianas resistentes a medicamentos (Xuan et al., 2023). Além da atividade antimicrobiana, os AMPs também possuem atividades antibiofilme, imunorregulatórias, entre outras (Luo & Song, 2021). Os fragmentos de AMP têm como alvo as paredes bacterianas, o que proporciona diferenciar uma infecção bacteriana de uma inflamação. A seleção de fragmentos peptídicos apropriados permite, portanto, melhorar o rastreamento de infecções diretamente nos tecidos, limitando a atividade bactericida do AMP (Pardoux et al., 2020). Nos últimos anos, os AMPs têm sido cada vez mais investigados como ligados aos biossensores por apresentar alta estabilidade e múltiplos locais de captura bacteriana. Atuando como biorreceptores seletivos destinados à detecção de patógeno, isso decorre das suas propriedades inerentes de hidrofobicidade e carga, que lhes permitem ligar-se de forma específica a membranas bacterianas (Stern Bauer et al., 2023).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um biossensor nanoestruturado impedimétrico baseado em monocamadas automontadas de cisteína (Cys), nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) revestidas por casca de ouro (Au) e quitosana (núcleo-casca de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Au-Quit) associados ao peptídeo Temphylarata para a biodetecção de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) revestidas por casca de ouro (Au) e quitosana (núcleo-casca de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Au-Quit);
- Obter monocamadas automontadas através do uso de cisteína para imobilização

de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au-Quit para o desenvolvimento do biossensor;

- Imobilizar o peptídeo Temphyllarata nos eletrodos funcionalizados com nanoestruturas;
- Determinar as correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) das diferentes etapas de modificação da superfície do eletrodo para obtenção do biossensor nanoestruturado;
- Caracterizar a plataforma biossensora por meio da técnica da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) pela avaliação dos diagramas de Nyquist e determinação do circuito equivalente;
- Avaliar comportamento interfacial da capacitância da dupla camada elétrica, resistência de transferência de carga e resistência de Warburg;
- Avaliar a performance do biossensor frente a amostras de diferentes espécies de bactérias por meio das análises eletroquímicas;
- Caracterizar as nanoestruturas sintetizadas pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- Analisar morfológica e estruturalmente o sistema sensor antes e após interação com os microrganismos através da microscopia de força atômica (AFM).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

Cisteína (Cys), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (EUA). Ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), ferrocianeto de potássio ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico foram obtidos pela VETEC (Brasil). Água deionizada ultrapura utilizada em todas as etapas dos experimentos foi obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA). O peptídeo Temphylarata foi preparado em uma concentração de 250  $\mu$ M.

### 4.2 IMOBILIZAÇÃO DE CAMADA AUTOMONTADA

Os eletrodos foram polidos com papel lixa fino (tamanho de grão 4000), seguido de pasta de alumina. Os eletrodos passaram pela sonicação durante 1 minuto em água. Os eletrodos foram imersos em solução de  $1 \times 10^{-3}$  M de cisteína (Cys). O enxágue foi completado com água para remover qualquer material não imobilizado na superfície do eletrodo. O eletrodo foi modificado com a Cys e imerso em solução aquosa / etanol (1:1 v/v) contendo 0.4 M de EDC e 0.1 M de NHS durante 10min. Para remover o material não tratado, o eletrodo foi lavado com água. Finalmente, foi gotejado no eletrodo a solução de núcleo-casca durante 25min.

### 4.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Inicialmente, foi suspenso  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (8 mM) e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (4 mM) em 50 mL de água deionizada, homogeneizado em agitação magnética e aquecido a  $70^\circ\text{C}$  por 1h, de acordo com (Tessarolli et al., 2019), com algumas modificações. Posteriormente, foi adicionado 5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à solução anterior, que imediatamente adquire uma coloração preta, indicando a formação das nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). A solução foi mantida em agitação magnética até atingir  $24^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram coletadas as amostras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sob campo magnético e lavadas com água e etanol até a solução alcançar pH 7. Finalmente, as amostras foram secadas na estufa 38 ( $\sim 50^\circ\text{C}$ ) e estocadas em frasco âmbar em temperatura ambiente.

#### 4.4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -OURO@QUITOSANA (NÚCLEO-CASCA)

As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram dispersas em uma solução de 0.1 M  $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em um béquer de fundo plano por 20 minutos usando sonicação e, em seguida, misturadas lentamente em uma incubadora de agitação a  $38^\circ\text{C}$  para permitir a adsorção de  $\text{Au}^{3+}$  na superfície de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . As nanopartículas núcleo-casca foram lavadas com água pura até o pH atingir 7.

As NP de quitosana foram sintetizadas pela técnica de gelificação iônica de acordo com (Galindo et al., 2020) com algumas modificações. O volume de 8 mL da solução de TPP (1 mg/mL) foi adicionado por gotejamento e sob agitação magnética a 15 mL de solução de quitosana (2 mg/mL), previamente dissolvida em ácido acético 0,1 M e com pH ajustado para 4,4. Após a adição de TPP, as soluções foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente durante 1 hora. A concentração de quitosana e TPP ao final do processo foi de 1,3 mg/mL e 0,3

mg/mL. A proporção de quitosana e TPP, bem como as condições de processo foram definidas por testes preliminares.

#### 4.5 CULTURA DOS MICRORGANISMOS E EXPERIMENTOS DE BIORRECONHECIMENTO

Espécies de Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* e a espécie *Staphylococcus aureus*, Gram-positiva, foram semeadas em ágar Mueller-Hinton por 24h a 37°C. Essas amostras foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Para se avaliar o biorreconhecimento do microrganismo pelo biossensor proposto, o biossensor foi imerso na suspensão com determinado microrganismo durante 5 min em temperatura ambiente. Água ultrapura foi utilizada para remover os microrganismos não ligados, e posteriormente o biossensor foi submetido a análise eletroquímica.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

As medidas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato  $\mu$ Autolab (Metrohm, Holanda) controlado pelo software NOVA 1.11. Uma célula eletroquímica foi utilizada, onde uma solução 10mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  /  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  (1:1, v/v) preparada em tampão fosfato (PBS, pH 7.4) foi usada como sonda redox. Durante os experimentos foram utilizados uma célula composta por três eletrodos, como seguem: eletrodo de trabalho de ouro (ET), fio de platina como contra-eletrodo (CE) e Ag/AgCl (saturado com KCl) como eletrodo de referência (ER). A voltametria

cíclica foi realizada com potencial entre 0.7 e -0.2 V a uma taxa de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. Os espectros de impedância foram registrados a uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz em uma amplitude do potencial de onda senoidal de 10 mV. O software OriginPro8 foi utilizado na montagem e análise dos gráficos voltamétricos e impedimétricos.

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL

A análise morfológica do biossensor foi realizada utilizando um microscópio de força atômica SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Japão). Foram empregados cantilevers com ponta de silício (Nanoworld, Japão, frequência ressonante de 300 kHz e constante de força de 42 N·m<sup>-1</sup>) no modo de não contato, a uma temperatura de 25 °C ± 1 °C.

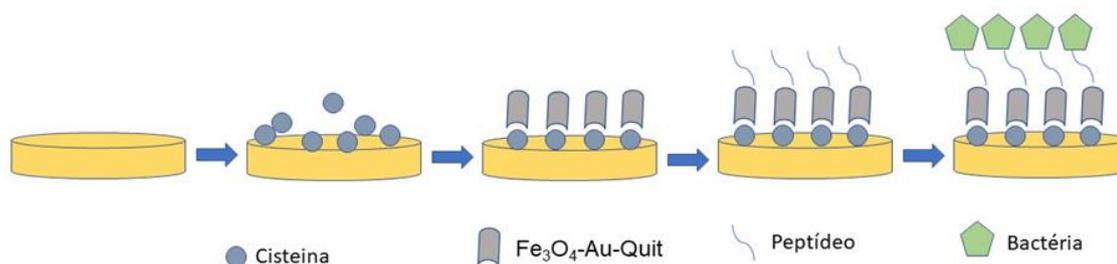
Medições de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das nanopartículas e do núcleo casca puras foram realizadas na faixa de número de onda entre 1000 cm<sup>-1</sup> e 4000 cm<sup>-1</sup>, utilizando o espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Rowville, Austrália).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PLATAFORMA SENSORA $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au@Qui-TEM}$

A imobilização dos  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au@Qui}$  e PAM TEM foi realizada através da modificação da superfície de ouro (BGE) do eletrodo de trabalho, conforme esquematização (Figura 5). Sequencialmente, o BGE limpo é modificado pela adsorção de cisteína, que servirá como conexão entre os outros elementos da plataforma, além de aumentar a superfície de contato. Após adição da cisteína, temos o acoplamento do EDC:NHS para favorecer a conectividade com o núcleo-casca que virá a seguir. Outra camada de EDC:NHS será depositada e por fim o peptídeo.

**Figura 5.** Esquematização da plataforma sensora.



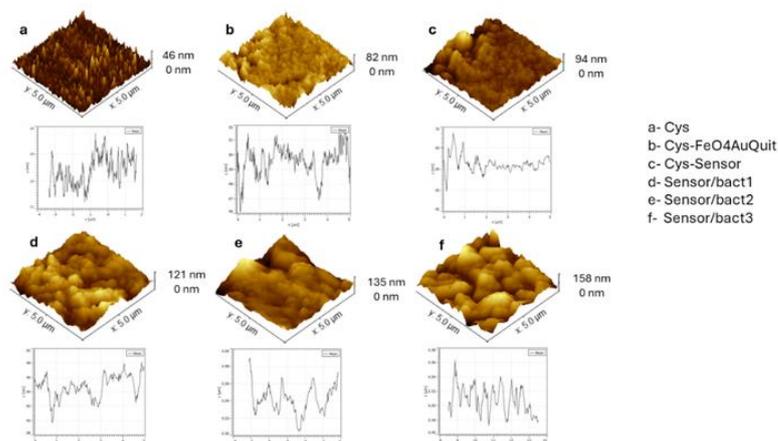
**Fonte:** Próprio autor, 2024

### 5.2 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA

#### 5.2.1 AFM

A análise topográfica das etapas de montagem do biossensor e as mudanças na superfície após o processo de adsorção do TEM e biorreconhecimento das amostras de microrganismos foram avaliadas via AFM (Figura 6). Na figura, observa-se a superfície do eletrodo após o processo de adsorção dos componentes  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au@Qui}$ , na qual formou-se picos e depressões com altura 82 nm corroborando com o trabalho de (Shanmugam et al., 2024)

**Figura 6.** Resposta do AFM frente a plataforma sensora e as bactérias.



**Fonte:** próprio autor, 2024.

Após a adsorção do peptídeo observou-se a uniformização da superfície com diminuição na rugosidade do perfil topográfico, aumentando a altura dos picos (94nm) sendo um indicativo de adesão, como demonstrado no trabalho de Silva-Junior (Da Silva-Junio, et al., 2022b). Quando acontece o contato com o patógeno, no caso a bactéria *S. aureus* (Figura 6d), o sensor revela alterações morfológicas com altura de 121 nm, caracterizando o biorreconhecimento.

Contudo, quando o sensor interage com bactérias Gram-negativas (Figura 6e e 6f) há uma mudança na caracterização topográfica, passando a apresentar vales e picos 125 e 158 nm, respectivamente.

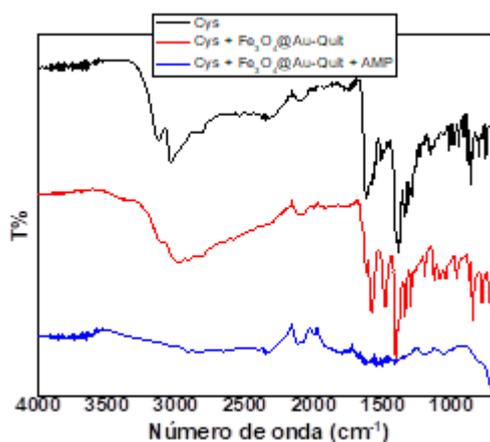
O reconhecimento das bactérias Gram-negativas resultou em alturas maiores que o reconhecimento do grupo Gram-positivo. Resultados semelhantes foram relatados por Silva Junior, et al (Silva junior, et al., 2018).

### 5.2.2 FTIR

A região média de espectro utilizada para avaliar a presença dos grupos funcionais foram  $4.000$  a  $1.000\text{ cm}^{-1}$  (Figura 7). As respostas do FTIR revelaram na banda de absorção  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  estando relacionado ao estiramento da ligação

OH (Lin et al., 2021). Contudo, o pico de absorção de 2920-2851 $\text{cm}^{-1}$  revelou o estiramento de dois grupos carbonila. O pico em 1470  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao grupo C=O (Alkahtane et al., 2022). Enquanto um pico observado em 1500  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuído à vibração de alongamento  $\text{F}_3\text{O}_4$  (Alkahtane et al., 2022).

**Figura 7.** Resposta das camadas do sensor frente a técnica FTIR

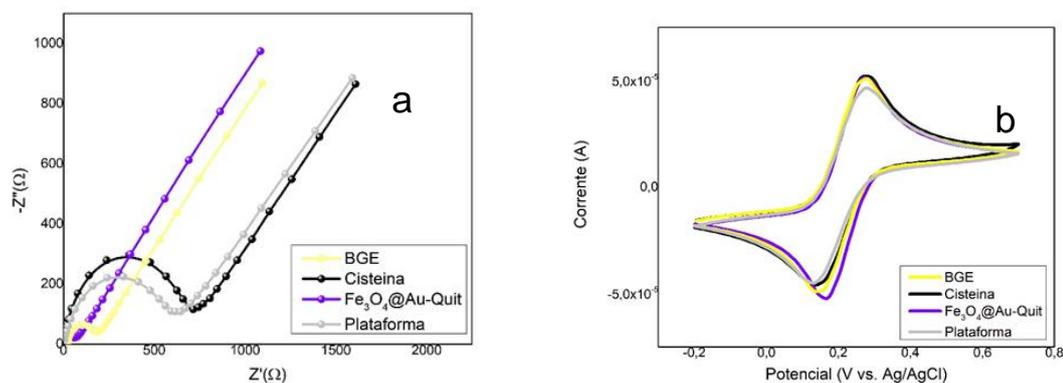


**Fonte:** próprio autor, 2024.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA SENSORA

As modificações do BGE foram analisadas através da EIS (Fig. 8a), a partir do  $R_{CT}$  (resistência à transferência de carga). Assim, o  $R_{CT}$  permite a avaliação da cinética de transferência de elétrons da sonda redox (Braga et al., 2023). No diagrama de Nyquist, formado pelos dados fornecidos pelo  $R_{CT}$ , observa-se a formação de um semicírculo no BGE limpo ( $R_{CT} = 113\Omega$ ) por causa da livre passagem de elétrons. Em contrapartida, ao cobrir a superfície de ouro com cisteína temos um aumento na resistência da passagem de elétrons ( $R_{CT} = 358\Omega$ ) por sua baixa condutividade de elétrons apresentada pela cisteína. Ao imobilizar  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -Quit, observa-se um semicírculo menor, resultante do aumento da condutividade fornecida pelas nanopartículas ( $R_{CT} = 120\Omega$ ) por possuir elementos que conduzem esses elétrons. Contudo, ao conjugar o TEM temos um aumento no semicírculo ( $R_{CT} = 306\Omega$ ) com referência a camada anterior, isso acontece, pois o peptídeo vai dificultar a passagem desses elétrons.

**Figura 8.** Processo de montagem da plataforma sensora: análise impedimétrica (a) e voltamétrica (b).

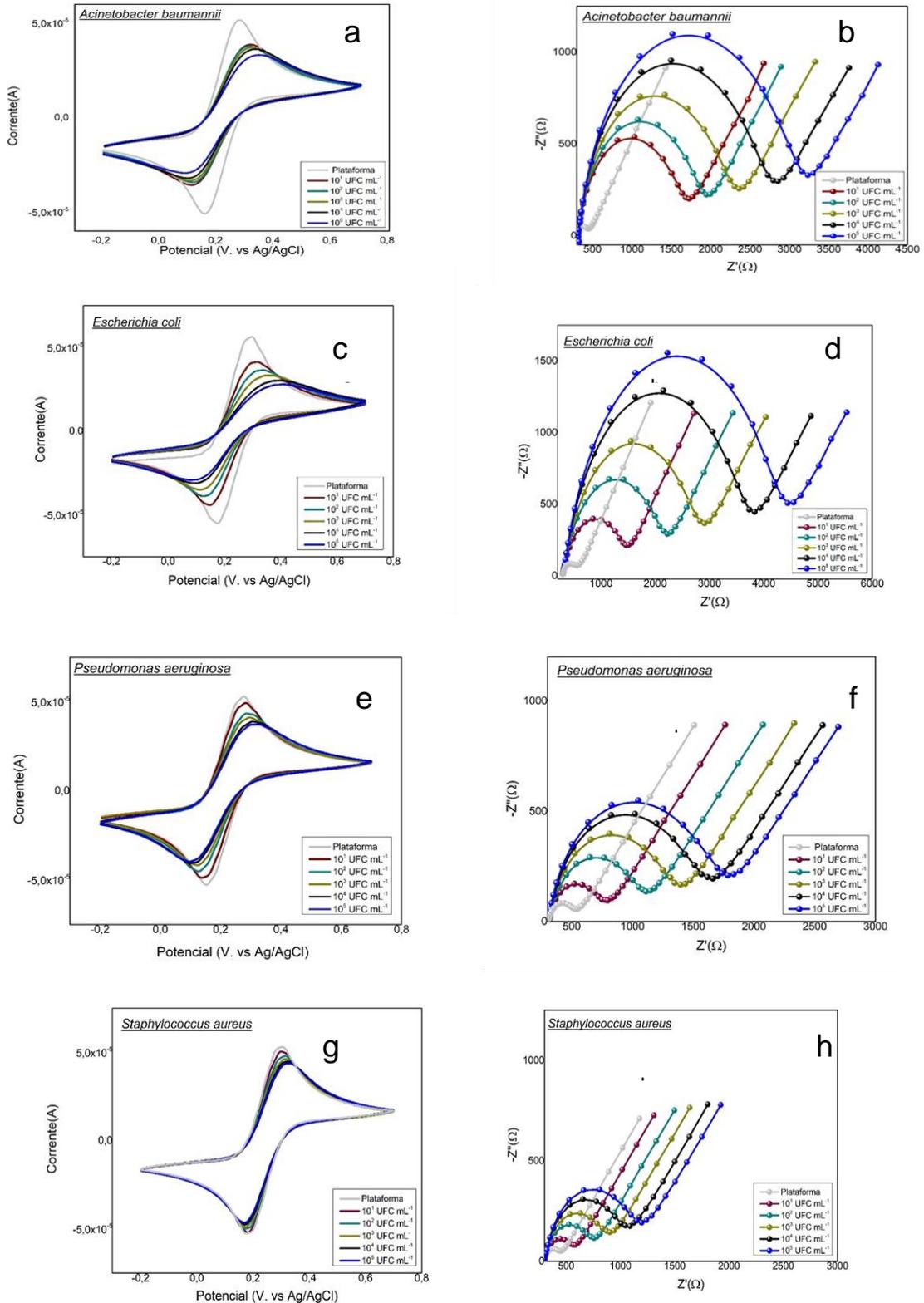


**Fonte:** próprio autor, 2024

O biossensor também foi avaliado via VC. O BGE limpo apresenta picos anódicos e catódicos na voltametria definidos (Fig. 8b), com uma resposta elétrica  $50,16\Omega$  no pico anódico. Contudo, ao adicionar a cisteína (cis) provocou um aumento da ipa  $68,23\Omega$  por conta da atração eletroestática entre seu grupo amina (positivo) e o par redox (negativo) aumentando o trânsito de elétrons (Moustakim et al., 2022). A cys liga-se ao ouro por causa do grupo tiol, que devido a sua forte atração com o ouro cria um fino filme altamente organizado, formando uma monocamada automontada (SAM). Ao adicionar  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au-Quit}$ , há uma redução no pico anódico, demonstrando assim uma boa capacidade elétrica. Deve-se às propriedades de condutividade presentes no  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e Au, favorecendo o fluxo de elétrons (German et al., 2020). Seguindo a direção contrária, ao adicionar o peptídeo TEM há uma significativa redução, indicando dificuldade na passagem dos elétrons.

## 5.4 PERFORMANCE ANALÍTICA DO BIOSENSOR

**Figura. 9.** Análise voltamétrica (a,c,e,g) e impedimétrica (b,d,f,h) da detecção dos microrganismos.



Fonte: Próprio autor, 2024.

Os resultados apresentados no voltamograma cíclico (Fig. 9 a,c,e,g) apontam uma redução gradual nos picos anódicos e catódicos, proporcional a concentração bacteriana. Indicando reconhecimentos desses microrganismos, pois o peptídeo TEM interage eletrostaticamente com elementos da parede bacteriana, dificultando a passagem de elétrons. A partir do diagrama de Nyquist (Fig. 9 b,d,f,h), podemos constatar uma maior resistência à transferência de cargas, associada ao aumento do diâmetro do semicírculo, nas bactérias Gram-negativas.

Os dados impedimétricos foram enquadrados ao circuito equivalente de Randles (Tabela 3), esse circuito é constituído de resistência de solução eletrolítica ( $R_S$ ); elemento de fase constante (CPE); resistência à transferência de carga ( $R_{CT}$ ) e a impedância de Warburg ( $Z_w$ ). Os valores de  $R_{CT}$  possuem relação com as modificações da interface eletroquímica do eletrodo.

**Tabela 3.** Valores dos elementos do circuito equivalente de Randles para a detecção dos microrganismos pela plataforma.

| Modificação do Eletrodo | CFU mL <sup>-1</sup> | Rct(kΩ) | CPE (μMho) | N     | Rs(Ω) | W (mMho) |
|-------------------------|----------------------|---------|------------|-------|-------|----------|
| Plataforma              | ***                  | 0,181   | 15,1       | 0,757 | 263   | 5,7      |
| P. aeruginosa           | 101                  | 0,837   | 16,6       | 0,838 | 276   | 9,4      |
|                         | 102                  | 0,969   | 17,3       | 0,845 | 270   | 8,6      |
|                         | 103                  | 1,125   | 16,5       | 0,834 | 253   | 8,4      |
|                         | 104                  | 1,255   | 15,8       | 0,894 | 288   | 8,6      |
|                         | 105                  | 1,404   | 15,3       | 0,835 | 305   | 8,5      |
| E. coli                 | 101                  | 1,16    | 39,1       | 0,757 | 293   | 7,5      |
|                         | 102                  | 1,89    | 31,6       | 0,782 | 292   | 7,6      |
|                         | 103                  | 2,55    | 28,5       | 0,796 | 294   | 7,4      |
|                         | 104                  | 3,42    | 25,8       | 0,807 | 300   | 8,0      |
|                         | 105                  | 4,61    | 21,0       | 0,813 | 305   | 8,0      |
| S. aureus               | 101                  | 0,558   | 23,4       | 0,793 | 347   | 9,3      |
|                         | 102                  | 0,698   | 22,8       | 0,841 | 327   | 9,2      |
|                         | 103                  | 0,949   | 18,6       | 0,826 | 315   | 9,3      |
|                         | 104                  | 1,11    | 18,0       | 0,841 | 314   | 9,3      |
|                         | 105                  | 1,42    | 16,8       | 0,835 | 306   | 9,3      |
| A. baumannii            | 101                  | 1,339   | 25,5       | 0,829 | 236   | 6,2      |
|                         | 102                  | 1,571   | 23,3       | 0,864 | 271   | 5,6      |
|                         | 103                  | 1,941   | 17,8       | 0,856 | 277   | 5,4      |
|                         | 104                  | 2,392   | 14,9       | 0,872 | 289   | 5,3      |
|                         | 105                  | 2,771   | 14,5       | 0,880 | 366   | 5,3      |

**Fonte:** próprio autor, 2024.

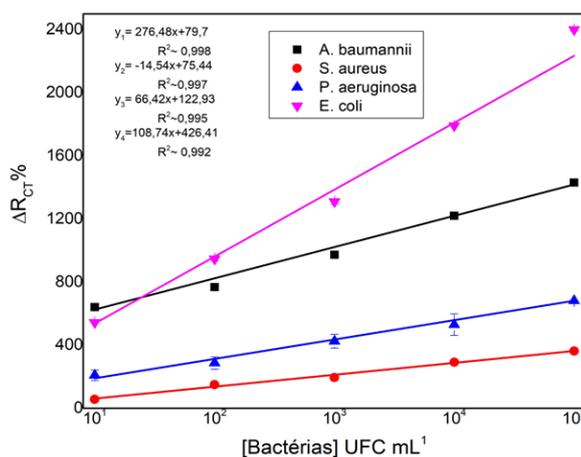
Através da tabela, observou-se que a interação com Gram-negativo se destaca. Isso acontece por conta do PAM, sua conformação anfifílica que possui uma superfície catiônica (Souza e Silva, et al., 2022). O mecanismo de interação com bactérias do grupo negativo está relacionado à composição da membrana carregada negativamente com lipopolissacarídeo (LPS) (Sohrabi, et al., 2023).

Baseada na variação da resistência à transferência de cargas ( $\Delta R_{CT}$ ) foi construída uma curva de calibração, usada na avaliação da capacidade analítica do biossensor, seguindo a fórmula:

$$\Delta R_{CT} = \frac{R_{CT}(bact) - R_{CT}(plat)}{R_{CT}(plat)} \times 100$$

Em que o  $R_{CT}$  condiz com o valor obtido após a exposição às suspensões bacterianas, enquanto que o  $R_{CT}$  (Plat.) está ligado ao  $R_{CT}$  da plataforma  $cis\text{-}Fe_3O_4@Au\text{-}Quit$  quando ocorreu a imobilização do TEM.

**Figura 10.** Variação relativa da  $R_{CT}$  do sistema sensor após exposição a diferentes espécies de microrganismos.



**Fonte:** Próprio autor, 2024.

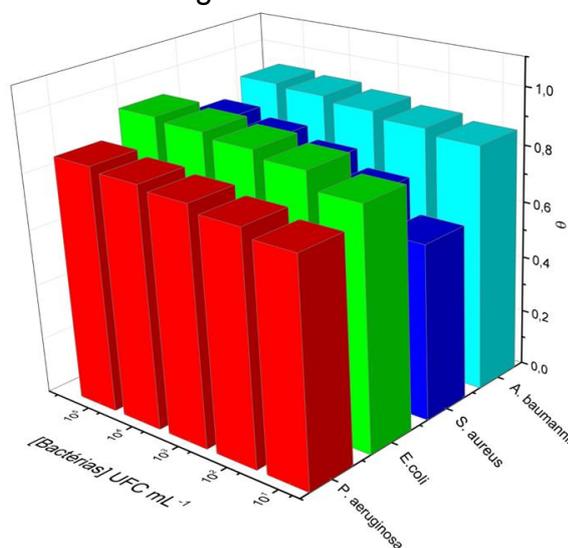
Como apontado, existe uma associação entre a concentração e as propriedades dos microrganismos analisados. O desenho linear de reconhecimento é explicado pela diferença na constituição dos alvos, mais especificamente em sua membrana. Logo, os valores de  $\Delta R_{CT}$  obtidos para o *S. aureus*, demonstram serem menores em comparação aos da *A. baumannii* e da *E. coli*. Esse fenômeno ocorre

por causa da constituição da barreira das bactérias Gram-positivas que apresentam alta quantidade de ácido lipoteicoico (LTA) (Sohrabi, et al., 2023). Esse arranjo mostra-se verdadeira com o resultado do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,95. Através da quantificação do recobrimento da camada sensora ( $\theta$ ) é possível avaliar os sítios de ligação ocupados pelas bactérias (Fig. 11), segundo a seguinte equação:

$$\theta = 1 - \frac{Rct(plat)}{Rct(bact)}$$

Onde o Rct (plat) é referente ao Rct da plataforma, ao passo que o Rct (bac) condiz com os valores de Rct depois da exposição bacteriana. Ao verificar o gráfico, observa-se que aumento de  $\theta$  está proporcionalmente associada à quantidade de colônias expostas. Além disso, houve uma afinidade maior por bactérias do grupo das Gram-negativas. Alguns estudos corroboram com essa hipótese, pois demonstraram a afinidade de peptídeos catiônicos por microrganismos Gram-negativos em detrimento dos Gram-positivos (Sohrabi, et al., 2023) Portanto, os valores de  $\theta$  acorda com os dados obtidos no  $\Delta R_{CT}$ . Assim, pode-se constatar que o sistema sensor interage com as células bacterianas e apresenta respostas específicas segundo a constituição da parede bacteriana.

**Figura 11.** Quantificação do recobrimento da camada sensora ( $\theta$ ) após exposição a diferentes espécies de microrganismos em diferentes concentrações



Fonte: próprio autor, 2024

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo, um biossensor eletroquímico baseado em monocamada de cisteína, núcleo-casca e peptídeo antimicrobiano TEM foi aplicado para detecção de bactérias Gram-negativas e Gram-positiva. O FTIR foi utilizado para identificação de grupos funcionais. Visando identificar e caracterizar esses grupos. Segundo os dados de EIE e VC, o núcleo casca demonstrou boa condutividade quando associados a monocamada de cisteína, a resistência de cargas na superfície do eletrodo e a associação desses componentes. Através do ipa e RCT tivemos evidências de que houve êxito em sua montagem. As informações fornecidas pelos cálculos  $\Delta RCT$  e  $\theta$  apresentou a correlação proporcional entre a concentração bacteriana e a resposta do biossensor, ficando evidente a identificação das bactérias e suas respectivas concentrações. Entretanto, novos testes usando soro de pacientes e outras espécies de bactérias devem ser realizados. Portanto, o biossensor proposto surge como uma alternativa promissora às técnicas convencionais de identificação bacteriana, com potencial para ser utilizado no futuro no reconhecimento de amostras clínicas e hospitalares.

## REFERÊNCIAS

ABID, S.A. ET AL. (2021) 'Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19', **Life Sciences**, 273(January), p. 119117. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119117>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025**. Brasília: [s.n.].

AHMED, N. sabah, Hsu, C.-Y., Mahmoud, Z. H., Sayadi, H., & kianfar, E. (2023). A graphene oxide/polyaniline nanocomposite biosensor: synthesis, characterization, and electrochemical detection of bilirubin. **RSC Advances**, 13(51), 36280–36292. <https://doi.org/10.1039/D3RA06815C>

AKINOSOGLOU, Davoulos, deLastic, Kolosaka, Niarou, Theodoraki, Ziazias, Kosmopoulou, Koutsouri, & Gogos. (2022). Managing hospitalized patients with bacterial infections: the price-to-pay upon site of infection. **Rural and Remote Health**. <https://doi.org/10.22605/RRH6347>

AL-BLOOSHI, S. Y., Latif, M. A. A., Sabaneh, N. K., Mgaogao, M., & Hossain, A. (2021). Development of a novel selective medium for culture of Gram-negative bacteria. **BMC Research Notes**, 14(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05628-2>

ALBUQUERQUE, I. L. T., Santos, P. T. A., Cornejo, D. R., Bicalho, S. M. C. M., Oliveira, L. S. C., & Costa, A. C. F. M. (2017). Modificação da superfície de nanocompósitos de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> visando seu uso para imobilização da glicose oxidase. **Cerâmica**, 63(366), 244–252. <https://doi.org/10.1590/0366-69132017633662080>

ALI, A. et al. (2022) 'Dynamics of a fractional order Zika virus model with mutant', **Alexandria Engineering Journal**, 61(6), pp. 4821–4836. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.aej.2021.10.031>.

AL-JODA, B. M. S. et al. Biochemical Testing Revision For Identification Several Kinds of Bacteria. **Journal of University of Babylon for Pure and applied science**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 168–176, 2021.

ALKAHTANE, A. A., Alghamdi, H. A., Aljasham, A. T., & Alkahtani, S. (2022). A possible theranostic approach of chitosan-coated iron oxide nanoparticles against human colorectal carcinoma (HCT-116) cell line. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 29(1), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.078>

ANTIOCHIA, R. (2021) 'Developments in biosensors for CoV detection and future trends', **Biosensors and Bioelectronics**, 173(May 2020), p. 112777. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112777>.

ANTIOCHIA, R. (2022) 'Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection: Voltametric or impedimetric transduction?', **Bioelectrochemistry**, 147(April), p. 108190. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108190>.

ARAÚJO, B. C. de, Melo, R. C. de, Bortoli, M. C. de, Bonfim, J. R. de A., & Toma, T. S. (2022). Prevenção e controle de resistência aos antimicrobianos na Atenção Primária à Saúde: evidências para políticas. **Ciência & Saúde Coletiva**, 27(1), 299–314. <https://doi.org/10.1590/1413-81232022271.22202020>

ÁVILA OLIVEIRA, B. D., Gomes, R. S., de Carvalho, A. M., Lima, E. M. F., Pinto, U. M., & da Cunha, L. R. (2024). Revolutionizing food safety with electrochemical biosensors for rapid and portable pathogen detection. **Brazilian Journal of Microbiology**, 55(3), 2511–2525. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01427-6>

BAKIRHAN, N. K., Topal, B. D., Ozcelikay, G., Karadurmus, L., & Ozkan, S. A. (2022). Current Advances in Electrochemical Biosensors and Nanobiosensors. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 52(3), 519–534. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1809339>

BALAKRISHNAN, V. S. (2022). WHO's first global infection prevention and control

report. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(8), 1122. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00459-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00459-5)

BHALLA, N. et al. **Introduction to biosensors. Essays in Biochemistry**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 1–8, 30 jun. 2016.

BONNET, M. et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. **New Microbes and New Infections**, Elsevier Ltd, [s.l.], v. 34, p. 100622, 1 mar. 2020.

BOPARAI, J. K. et al. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein & Peptide Letters**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 4–16, 23 ago. 2019.

BOPARAI, J. K., & Sharma, P. K. (2019). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein & Peptide Letters*, 27(1), 4–16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>

BORDBAR, M.M. et al. (2021) 'Disposable paper-based biosensors for the point-of-care detection of hazardous contaminations—A review.', **Biosensors**, 11(9), p. 316.

BRAGA, A. R. C., Nunes, M. C., & Raymundo, A. (2023). The Experimental Development of Emulsions Enriched and Stabilized by Recovering Matter from Spirulina Biomass: Valorization of Residue into a Sustainable Protein Source. *Molecules*, 28(17), 6179. <https://doi.org/10.3390/molecules28176179>

BRENNAN, L.M. et al. (2016) 'Preparation and testing of impedance-based fluidic biochips with RTgill-W1 cells for rapid evaluation of drinking water samples for toxicity', **Journal of Visualized Experiments**, 2016(109), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.3791/53555>.

BRETT, C. M. A. (2022). Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors. *Molecules*, 27(5), 1497. <https://doi.org/10.3390/molecules27051497>

BRITO, F. A. E. De, Bezerra, L. C. R., Melo, A. M. A., Furtado, R. F., Borges, M. De F., & Figueiredo, E. A. T. De. (2021). Validação De Métodos Microbiológicos Alternativos: Uma Visão Geral. **Brazilian Journal Of Food Technology**, 24. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.02320>

CAGLE, S. D., Hutcherson, B. L., & Wiley, A. T. (2022). Health Care-Associated Infections: Best Practices for Prevention. **American Family Physician**, 105(3), 262–270.

CAI, W., Guo, M., Weng, X., Zhang, W., Owens, G., & Chen, Z. (2020a). Modified green synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles for pH responsive drug release. **Materials Science and Engineering: C**, 112, 110900. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110900>

CARVALHO, L. A. de, Andrade, A. R. de, & Bueno, P. R. (2006). Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, 29(4), 796–804. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400029>

CAVALCANTE, de F.T. et al. (2021) 'Designing of nanomaterials-based enzymatic biosensors: Synthesis, properties, and applications.', **Electrochem**, 2(1), pp. 149–184.

CHEN, C. and Wang, J. (2020) 'Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review', **Analyst**, 145(5), pp. 1605–1628. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9an01998g>.

CHEUNG, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, 12(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>

CHORTI, P., Kazi, A. P., Wiederoder, M., & Christodouleas, D. C. (2021). High-Throughput Flow-Through Direct Immunoassays for Targeted Bacteria Detection. **Analytical Chemistry**, 93(44), 14586–14592.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02867>

CHRISTAKI, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>

CHURCH, D. L. et al. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical microbiology reviews*, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 1–74, 16 set. 2020.

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

DEEBANSOK, S., Deng, J., le Calvez, E., Zhu, Y., Crosnier, O., Brousse, T., & Fontaine, O. (2024). Capacitive tendency concept alongside supervised machine-learning toward classifying electrochemical behavior of battery and pseudocapacitor materials. *Nature Communications*, 15(1), 1133. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45394-w>

DING, J. and Qin, W. (2020) 'Recent advances in potentiometric biosensors', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 124, p. 115803. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115803>.

EKRAMI, E. et al. (2021) 'A review on designing biosensors for the detection of trace metals', *Applied Geochemistry*, 127(February), p. 104902. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104902>.

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

ENTER, B.J. van and Hauff, E. von (2018) 'Challenges and perspectives in continuous glucose monitoring.', *Chemical Communications*, 54(40), pp. 5032–

5045.

EYVAZI, S. et al. (2021) 'Recent advances on development of portable biosensors for monitoring of biological contaminants in foods', **Trends in Food Science and Technology**, 114(April), pp. 712–721. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.024>.

FARZIM, L. et al. (2018) 'Advances in the design of nanomaterial-based electrochemical affinity and enzymatic biosensors for metabolic biomarkers: A review.', **Microchimica Acta**, 185, pp. 1–25.

FATIMA, T., Bansal, S., Husain, S., & Khanuja, M. (2022). Biosensors. In *Electrochemical Sensors* (pp. 1–30). **Elsevier**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823148-7.00001-5>

FERREIRA, D.S.C. (2014) 'Desenvolvimento De Genossensores Para O Diagnóstico Do Papilomavírus Humano (**Hpv**)', p. 120.

FRANCO-DUARTE, R. et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, MDPI AG, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 130, 1 maio 2019.

GALINDO, M. V., Paglione, I. dos S., Coelho, A. R., Leimann, F. V., & Shirai, M. A. (2020). Produção de nanopartículas de quitosana e aplicação como revestimento em blendas de amido de mandioca e poli(ácido láctico). **Research, Society and Development**, 9(9), e505997694. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7694>

GERMAN, N. et al. Formation and electrochemical evaluation of polyaniline and polypyrrole nanocomposites based on glucose oxidase and gold nanostructures. **Polymers**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 1–20, 1 dez. 2020.

GLOWICZ, J. B., Landon, E., Sickbert-Bennett, E. E., Aiello, A. E., deKay, K., Hoffmann, K. K., Maragakis, L., Olmsted, R. N., Polgreen, P. M., Trexler, P. A., VanAmringe, M. A., Wood, A. R., Yokoe, D., & Ellingson, K. D. (2023). SHEA/IDSA/APIC Practice Recommendation: Strategies to prevent healthcare-associated infections through hand hygiene: 2022 Update. **Infection Control &**

*Hospital Epidemiology*, 44(3), 355–376. <https://doi.org/10.1017/ice.2022.304>

GOMES, A. A. G. et al. Infecções relacionadas à assistência em saúde em unidades de terapia intensiva no Brasil. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, [s.l.], v. 12, n. 11, p. e4665, 26 nov. 2020.

HASSAN, M.M. et al. (2022) 'Recent progress in chemometrics driven biosensors for food application', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116707>.

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

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

IBRAHIM, S., Al-Saryi, N., Al-Kadmy, I. M. S., & Aziz, S. N. (2021). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*, 48(10), 6987–6998. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>

JACINTO, M. J., Silva, V. C., Valladão, D. M. S., & Souto, R. S. (2021). Biosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: a review. *Biotechnology Letters*, 43(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03047-0>

JIAN, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61(12), 1049–1070. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>

JOSEPH, C., Daniels, A., Singh, S., & Singh, M. (2021). Histidine-Tagged Folate-Targeted Gold Nanoparticles for Enhanced Transgene Expression in Breast Cancer Cells In Vitro. *Pharmaceutics*, 14(1), 53. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010053>

Kaci, K., Enebral-Romero, E., Martínez-Periñán, E., Garrido, M., Pérez, E. M.,

López-Diego, D., Luna, M., González-de-Rivera, G., García-Mendiola, T., & Lorenzo, E. (2023). Multiplex Portable Biosensor for Bacteria Detection. *Biosensors*, 13(11), 958. <https://doi.org/10.3390/bios13110958>

**Karygianni**, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>

KAUR, J. et al. (2019) Enzyme-based biosensors, Bioelectronics and Medical Devices: From Materials to Devices - Fabrication, Applications and Reliability. **Elsevier Ltd**. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102420-1.00013-3>

KIM, M. et al. (2019) 'Impedimetric biosensors for detecting vascular endothelial growth factor (VEGF) based on poly(3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT)/gold nanoparticle (Au NP) composites', **Frontiers in Chemistry**, 7(MAR), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00234>.

LAKARD, S., Pavel, I.A. and Lakard, B. (2021) 'Electrochemical biosensing of dopamine neurotransmitter: A review', **Biosensors**, 11(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/bios11060179>.

LEAL, M. A.; DE FREITAS-VILELA, A. A. Costs of healthcare-associated infections in an Intensive Care Unit. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s.l.], v. 74, n. 1, 2021. 56

LEEUWEN, W. B. VAN. Molecular Diagnostics in Clinical Microbiology. **Iranian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 5–20, nov. 2009.

LEMIECH-MIROWSKA, E., Kiersnowska, Z., Michałkiewicz, M., Depta, A., & Marczak, M. (2021). Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(3), 361–366. <https://doi.org/10.26444/aaem/122629>

LEMINEUR, J.-F., Wang, H., Wang, W., & Kanoufi, F. (2022). Emerging Optical Microscopy Techniques for Electrochemistry. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 15(1), 57–82. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061020-015943>

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

LEVA-BUENO, J., Peyman, S. A., & Millner, P. A. (2020). A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(3), 343–362. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00668-0>

LI, W., Cao, Z., Liu, R., Liu, L., Li, H., Li, X., Chen, Y., Lu, C., & Liu, Y. (2019). AuNPs as an important inorganic nanoparticle applied in drug carrier systems. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 4222–4233. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1687501>

LI, X. et al. **Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides**. *Molecules*, [s.l.], v. 27, n. 9, 1 maio 2022.

Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022a). Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>

Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022a). Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>

Lin, C.-R., Ivanova, O. S., Petrov, D. A., Sokolov, A. E., Chen, Y.-Z., Gerasimova, M. A., Zharkov, S. M., Tseng, Y.-T., Shestakov, N. P., & Edelman, I. S. (2021). Amino-Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Core-Shell Magnetic Nanoparticles for Dye Adsorption. *Nanomaterials*, 11(9), 2371. <https://doi.org/10.3390/nano11092371>

LIU, J. et al. (2022) 'Application and Progress of Chemometrics in Voltammetric Biosensing', *Biosensors*, 12(7), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.3390/bios12070494>.

LOPES ARAÚJO, P. et al. Prevalência de infecção relacionada à assistência à saúde em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Enfermería Global**, [s.l.], v. 52, p. 291–303, 2018.

LUNDIN, P. M., Fiser, B. L., Blackledge, M. S., Pickett, H. L., & Copeland, A. L. (2022). Functionalized Self-Assembled Monolayers: Versatile Strategies to Combat Bacterial Biofilm Formation. **Pharmaceutics**, 14(8), 1613. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081613>

LUO, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>

M. F. Amaral, E., C. B. de Andrade, J., B. de Freitas, L., T. L. Teixeira, G., P. L. do Nascimento, J., v. Gelamo, R., B. Leite, N., & A. Moreto, J. (2023). Electrochemical Sensors and Biosensors: Their Basic Working Principles and Some Applications. **Revista Virtual de Química**, 15(3), 519–535. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20220112>

MAHONY, J. O., Nolan, K., Smyth, M. R., & Mizaikoff, B. (2005). Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, 534(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.07.043>

MAIA, P. L. C. et al. Atenção farmacêutica: uma abordagem sobre a resistência antimicrobiana e o uso inadequado na vida cotidiana / Pharmaceutical attention: an approach to antimicrobial resistance and improper use in everyday life. **Brazilian Journal of Development**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 43347–43362, 30 abr. 2021.

MAJUMDER, M. A. A. et al. Antimicrobial stewardship: Fighting antimicrobial resistance and protecting global public health. **Infection and Drug Resistance**, [s.l.], v. 13, p. 4713–4738, 2020.

MALECKA-Baturo, K. (2022) 'Advances in Electrochemical Sensors and Biosensors',

**Coatings**, 12(8), pp. 10–13. Available at: <https://doi.org/10.3390/coatings12081052>

MIRRES, A. C. de M., Silva, B. E. P. de M. da, Tessaro, L., Galvan, D., Andrade, J. C. de, Aquino, A., Joshi, N., & Conte-Junior, C. A. (2022). Recent Advances in Nanomaterial-Based Biosensors for Pesticide Detection in Foods. **Biosensors**, 12(8), 572. <https://doi.org/10.3390/bios12080572>

MOHAMMED, S. J., Al-Musawi, A. T., Al-Fraji, A. S., & Kareem, H. S. (2022). Comparison of three culture media in assessing the sensitivity of antibiotics to common foodborne microorganisms. **Journal of Medicine and Life**, 15(5), 645–649. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0404>

MONOŠÍK, R., Stred'anský, M. and Šturdík, E. (2012) 'Biosensors — classification, **characterization and new trends**', 5(1), pp. 109–120. Available at: <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>.

MORRISON, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, 30(4), 619–635. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2020.06.004>

MOUSTAKIM, H. et al. Electrochemical DNA Biosensor Based on Immobilization of a Non-Modified ssDNA Using Phosphoramidate-Bonding Strategy and Pencil Graphite Electrode Modified with AuNPs/CB and Self-Assembled Cysteamine Monolayer. **Sensors**, [s.l.], v. 22, n. 23, p. 9420, 2 dez. 2022.

NARESH, Varnakavi., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors**, 21(4), 1109. <https://doi.org/10.3390/s21041109>

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

OLIVEIRA, N.C.L. (2017) Desenvolvimento De Biossensores Para As Ciências

Forenses. Paniel, N. et al. (2013) 'Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples', **Methods**, 64(3), pp. 229–240. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.001>.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022**. Genebra: [s.n.], 2022.

PANG, B. et al. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157:H7 detection. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 542, p. 58–62, 1 fev. 2018.

PANIEL, N. et al. (2013) 'Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples', **Methods**, 64(3), pp. 229–240. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.001>.

PARDOUX, É. Et al. Antimicrobial peptides as probes in biosensors detecting whole bacteria: A review. **Molecules MDPI AG**, [s.l.], v. 25, n. 8, 1 abr. 2020.

PARDOUX, É., Boturn, D., & Roupioz, Y. (2020). Antimicrobial Peptides as Probes in Biosensors Detecting Whole Bacteria: A Review. **Molecules**, 25(8), 1998. <https://doi.org/10.3390/molecules25081998>

PEÑA, B., Adbel-Hafiz, M., Cavasin, M., Mestroni, L., & Sbaizero, O. (2022). Atomic Force Microscopy (AFM) Applications in Arrhythmogenic Cardiomyopathy. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(7), 3700. <https://doi.org/10.3390/ijms23073700>

PERANTONI, I. m.; queiroz-fernandes, g. m. de. **Evolução das Técnicas Diagnósticas em Microbiologia Clínica**. Salusvita, Bauru, [s.l.], v. 38, n. 2, p. 529–542, 2019.

RADHAKRISHNAN, R. et al. (2014) 'Impedance biosensors: Applications to sustainability and remaining technical challenges', **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 2(7), pp. 1649–1655. Available at: <https://doi.org/10.1021/sc500106y>.

RADÓN, A., Drygała, A., Hawelek, Ł., & Łukowiec, D. (2017). Structure and optical properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized by co-precipitation method with different organic modifiers. *Materials Characterization*, 131, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.06.034>

RAMANAVICIUS, S. and Ramanavicius, A. (2021) 'Charge transfer and biocompatibility aspects in conducting polymer-based enzymatic biosensors and biofuel cells.', *Nanomaterials*, 11(2), p. 371

RAMYA, M., Senthil Kumar, P., Rangasamy, G., Uma shankar, V., Rajesh, G., Nirmala, K., Saravanan, A., & Krishnapandi, A. (2022). A recent advancement on the applications of nanomaterials in electrochemical sensors and biosensors. *Chemosphere*, 308, 136416. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136416>

REYNOLDS, D., & Kollef, M. (2021). **The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update.** *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>

RILEY, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: Escherichia coli. *Microbiology Spectrum*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>

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

RIZEQ, B. R., Younes, N. N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5776. <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>

RODRÍGUEZ-ZAMORA, P., Cordero-Silis, C. A., Fabila, J., Luque-Ceballos, J. C., Buendía, F., Heredia-Barbero, A., & Garzón, I. L. (2022). Interaction Mechanisms

and Interface Configuration of Cysteine Adsorbed on Gold, Silver, and Copper Nanoparticles. *Langmuir*, 38(18), 5418–5427. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c03298>

ROHDE, M. Microscopy. Em: **Methods in Microbiology**. Ed. 38. [s.l: s.n.], 2011, p. 61–100.

ROMANHOLO, P.V.V. et al. (2021) ‘Biomimetic electrochemical sensors: New horizons and challenges in biosensing applications’, *Biosensors and Bioelectronics*, 185(January), p. 113242. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113242>.

ROUSSO, I., & Deshpande, A. (2022). **Applications of Atomic Force Microscopy in HIV-1 Research**. *Viruses*, 14(3), 648. <https://doi.org/10.3390/v14030648>

ROUSSO, I., & Deshpande, A. (2022). Applications of Atomic Force Microscopy in HIV-1 Research. *Viruses*, 14(3), 648. <https://doi.org/10.3390/v14030648>

SALAMANDANE, A., Vila-Boa, F., Malfeito-Ferreira, M., & Brito, L. (2021). High Fecal Contamination and High Levels of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Water Consumed in the City of Maputo, Mozambique. *Biology*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/biology10060558>

SANDERSON, J. (2020). Fundamentals of Microscopy. *Current Protocols in Mouse Biology*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/cpmo.76>

SANI, A., Cao, C., & Cui, D. (2021). Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100991. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100991>

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

SCHACHINGER, F. et al. (2021) ‘Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes.’, *Molecule*, 26(15), p. 4525.

SHANMUGAM, R., Tharani, M., Abullais, S. S., Patil, S. R., & Karobari, M. I. (2024).

Black seed assisted synthesis, characterization, free radical scavenging, antimicrobial and anti-inflammatory activity of iron oxide nanoparticles. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 24(1), 241. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04552-9>

SHEIKHZADEH, E. et al. Nanomaterial application in bio/sensors for the detection of infectious diseases. **Talanta**, [s.l.], v. 230, p. 122026, ago. 2021.

SILVA, E. P. DA et al. Identificação dos principais patógenos responsáveis por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal: Revisão Integrativa. **Research, Society and Development**, [s.l.], v. 11, n. 6, p. e30111628991, 28 abr. 2022

SINGH, A. et al. Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope. **Biosensors MDPI**, [s.l.], v. 6, n. 69, p. 64993- 65011, 1 set. 2021

SINGH, R., & Bhatia, R. (2021). Core–shell nanostructures: a simplest two-component system with enhanced properties and multiple applications. **Environmental Geochemistry and Health**, 43(7), 2459–2482. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00766-1>.

SOTO, D., & Orozco, J. (2022). Hybrid Nanobioengineered Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors. **Molecules**, 27(12), 3841. <https://doi.org/10.3390/molecules27123841>

SOUZA E SILVA, P., Ferreira, M. A., de Moraes, L. F. R., de Barros, E., Preza, S. L. E., Cardoso, M. H., Franco, O. L., & Migliolo, L. (2022). Synthetic peptides bioinspired in temporin-PTa with antibacterial and antibiofilm activity. **Chemical Biology & Drug Design**, 100(1), 51–63. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14052>.

STERN BAUER, T. et al. Impedimetric Bacterial Detection Using Random Antimicrobial Peptide Mixtures. **Sensors**, [s.l.], v. 23, n. 2, 1 jan. 2023

Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR).

**British Journal of Biomedical Science**, 80. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>

TANG, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, 80. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>

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

TENOVER, F. C., Nicolau, D. P., & Gill, C. M. (2022). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* –an emerging challenge. **Emerging Microbes & Infections**, 11(1), 811–814. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2048972>

TESINI, B. L., & Dumyati, G. (2023). Health Care-Associated Infections in Older Adults. **Infectious Disease Clinics of North America**, 37(1), 65–86. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.11.004>

Tessarolli, B. O., Silva, P. V. da, Gallardo, E. C., & Magdalena, A. G. (2019). Síntese e caracterização de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>. **Matéria (Rio de Janeiro)**, 24(4). <https://doi.org/10.1590/s1517-707620190004.0831>

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

VÁRADI, L. et al. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future. *Chemical Society Reviews*, **Royal Society of Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 16, p. 4818- 4832, 21 ago. 2017.

VILLALONGA, A. et al. (2022) 'Electrochemical biosensors for food bioprocess monitoring', **Current Opinion in Food Science**, 43, pp. 18–26. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.006>.

VIVIER, V., & Orazem, M. E. (2022). Impedance Analysis of Electrochemical Systems. **Chemical Reviews**, 122(12), 11131–11168. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00876>

WANG, F., Ding, X., Niu, X., Liu, X., Wang, W., & Zhang, J. (2020). Green preparation of core-shell Cu@Pd nanoparticles with chitosan for glucose detection. *Carbohydrate Polymers*, 247, 116647. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116647>

WANG, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17). <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>

WANG, R., & Wang, Y. (2021). Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Oral Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1206. <https://doi.org/10.3390/ijms22031206>

WANG, S. et al. (2021) 'Electrochemical impedance spectroscopy', *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), p. 41

XIA, F., & Youcef-Toumi, K. (2022). Review: Advanced Atomic Force Microscopy Modes for Biomedical Research. *Biosensors*, 12(12), 1116. <https://doi.org/10.3390/bios12121116>

XIA, F., & Youcef-Toumi, K. (2022). Review: Advanced Atomic Force Microscopy Modes for Biomedical Research. *Biosensors*, 12(12), 1116. <https://doi.org/10.3390/bios12121116>

XIAO, Y., Zhang, T., & Zhang, H. (2023). Recent advances in the peptide-based biosensor designs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 231, 113559. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2023.113559>

XU, S. et al. (2017) 'Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor.', *Nature communications*, 8(1), p. 14902.

XUAN, J., Feng, W., Wang, J., Wang, R., Zhang, B., Bo, L., Chen, Z.-S., Yang, H., & Sun, L. (2023). Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resistance Updates*, 68, 100954.

<https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100954>

ZHANG, F.T. et al. (2016) 'Immobilization-free DNA-based homogeneous electrochemical biosensors', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 85, pp. 17–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.08.012>.

ZHOU, Q., Fan, L., Lai, X., Tan, L., & Zhang, X. (2019). Estimating extra length of stay and risk factors of mortality attributable to healthcare-associated infection at a Chinese university hospital: a multi-state model. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 975. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4474-5>

ZHOU, X.; LI, Y. (EDS.). Techniques for Oral Microbiology. Em: **Atlas of Oral Microbiology**. ed. 1. [s.l.]: Elsevier, 2015. p. 15–40.

ZIDARIČ, T. et al. (2022) 'Artificial biomimetic electrochemical assemblies', *Biosensors*, 12(1), p. 44